

# Invasionsverhalten von Gruppe G Streptokokken

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von : Patricia Wegmeyer

aus : Gifhorn

1. Referent : Prof. Dr. G.S. Chhatwal

2. Referent : Prof. Dr. D. Jahn

eingereicht am : 09.06.2005

mündliche Prüfung (Disputation) am : 02.09.2005

**Inhaltsverzeichnis****Seite**

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1. Streptokokken der Gruppe G (GGS).....	3
1.2. Epidemiologie .....	3
1.3. Krankheitsbilder.....	4
1.4. Virulenzfaktoren von Gruppe G Streptokokken.....	5
1.5. SfbI – Fibronectin Bindungsprotein von Gruppe A Streptokokken.....	9
1.6. GfbA- Fibronectin Bindungsprotein von Gruppe G Streptokokken .....	11
1.7. Ziele dieser Arbeit .....	12
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1. Verwendete Bakterienstämme .....	13
2.1.1. Kulturmedien für Bakterien .....	14
2.1.2. Kultivierung und Erhalt der Bakterien .....	15
2.2. Eukaryontische Zellen.....	15
2.2.1. Zelllinien.....	15
2.2.2. Medien für die Zellkultur.....	15
2.2.3. Anzucht und Kultivierung der Zellen.....	16
2.3. Verwendete Antikörper.....	16
2.4. Oligodesoxyribonucleotide ( Primer).....	18
2.5. Puffer und Lösungen.....	19
2.6. Materialien, Chemikalien, Vektoren .....	25
2.6.1. Chemikalienliste.....	27
2.6.2. Vektoren .....	27
<b>2.7. Molekularbiologische Arbeiten.....</b>	<b>27</b>
2.7.1. Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken der Gruppe A und G .....	27
2.7.2. Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	28
2.7.3. Polymerase-Ketten-Reaktion ( PCR ).....	28
2.7.4. Agarosegelelektrophorese.....	29
2.7.5. Herstellung einer Sonde für die Southern-Blot-Analyse .....	30
2.7.6. Southern Blot und Entwicklung der Blotmembran.....	30

2.7.7.	Ligation.....	32
2.7.8.	Klonierungen .....	32
2.7.8.1.	Klonierung von Gfbl in den GST-Fusionsvektor pGEx-6P-1.....	32
2.7.8.2.	Klonierungen für die knock-out-Mutante (TF59).....	33
2.7.9.	Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> .....	35
2.7.10.	Transformation.....	35
2.7.10.1.	Transformation von <i>E.coli</i> .....	35
2.7.10.2.	Transformation von GGS mittels Elektroporation .....	35
2.7.11.	Sequenzierung von DNA.....	36
2.7.12.	Elektronische Datenverarbeitung .....	37
<b>2.8.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>38</b>
2.8.1.	Herstellung und Aufreinigung von rekombinantem Gfbl- Fusionsprotein.....	38
2.8.2.	Funktionaler Aktivitätsnachweis im Overlay-Blot.....	39
2.8.2.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.8.2.2.	Western Blot.....	39
2.8.3.	Abspaltung von GST und Reinigung des rekombinanten Proteins....	40
2.8.4.	Generierung von Serum gegen rekombinantes GST-Gfbl- Protein...40	
2.8.5.	Funktionaler Aktivitätsnachweis im Immunoblot (Dot blot).....	40
2.8.6.	Säulenchromatographische Aufreinigung von Serum-IgG.....	41
2.8.7.	Gewinnung spezifischer Antikörper gegen Gfbl mittels Kopplung von rekombinantem Gfbl an CNBr-Sepharose.....	41
2.8.8.	Kopplung von rekombinantem Protein an Latex-Beads.....	42
<b>2.9.</b>	<b>Invasionsversuche in der Zellkultur.....</b>	<b>43</b>
2.9.1.	Infektion für DIF und REM.....	43
2.9.2.	Infektion für TEM .....	44
2.9.3.	Bestimmung der Adhäsions-und Invasionsrate von GAS und GGS.....	45
2.9.4.	Inhibierungsversuche zur Adhärenz-und Invasion von GAS und GGS.....	45
<b>2.10.</b>	<b>Bindungsversuche mit radioaktiv markierten Proteinen.....</b>	<b>46</b>
2.10.1.	Radioaktive Markierung von Proteinen.....	46
2.10.2.	Bindungsversuche mit <sup>125</sup> I-markierten Proteinen.....	47

<b>2.11. Mikroskopische Untersuchungsmethoden und deren Vorbereitung.....</b>	<b>48</b>
2.11.1    Doppelimmunfluoreszenz (DIF) für Adhäsion/Invasion und Kolokalisations-Experimente.....	48
2.11.2    Raster-Elektronenmikroskopie (REM).....	49
2.11.2.1.    Entwässerungsreihe.....	49
2.11.2.2.    Kritische Punkttrocknung.....	49
2.11.2.3.    Gold-Bedampfung (Sputtern).....	49
2.11.2.4.    Mikroskopische Analyse.....	49
2.11.3.    Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	50
2.11.3.1.    Kontrastierung mit Osmium-Tetroxid.....	50
2.11.3.2.    Einbettung der Proben .....	50
2.11.3.3.    Fräsen der Präparate.....	51
2.11.3.4.    Ultramikrotomie.....	51
2.11.3.5.    Nachkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat.....	51
2.11.3.6.    Mikroskopische Analyse.....	52
<b>3.    Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
<b>3.1.    Identifizierung des für die Fibronectinbindung verantwortlichen Genes             im Stamm G59.....</b>	<b>53</b>
3.1.1.    Identifikation von Fibronectin bindenden GGS im radioaktiven Bindungsversuch ( $I^{125}$ -markiertem Fibronectin 70 kDa Fragment)...	53
3.1.2.    Detektion des für die Fibronectinbindung verantwortlichen Gens mittels Southern Blot- Hybridisierung .....	54
3.1.3.    Klonierung, Sequenzierung und anschließende Sequenzvergleiche mit bekannten Genen.....	55
3.1.4.    Proteinsequenz und Vergleich mit bekannten Proteinen.....	58
<b>3.2.    Charakterisierung des Fibronectin bindenden Proteins GfbI.....</b>	<b>60</b>
3.2.1.    Klonierung, Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins.....	60.
3.2.2.    GfbI ist ein Fibronectin bindendes Protein .....	61
3.2.3.    Rekombinantes GfbI vermittelt Adhäsion an und Invasion in humane Epithelzellen .....	61
3.2.3.1.    Kopplung des rekombinanten Proteins an Latex Beads.....	61
3.2.3.2.    Infektion von humanen Epithelzellen mit GfbI-gekoppelten Latex Beads (REM und DIF-Analysen) .....	63

<b>3.3. Generierung einer knock-out-Mutante.....</b>	<b>66</b>
3.3.1. Generierung des Insertionskonstruktes.....	66
3.3.2. Überprüfung der Transformanten mittels Southern Blot.....	68
3.3.3. Überprüfung der Transformanten mittels PCR.....	70
3.3.4. Überprüfung der Transformanten mittels Ansequenzieren.....	72
 <b>3.4. Charakterisierung der Adhäsion und Invasion im Vergleich</b>	
<b>Wildtyp versus Mutante .....</b>	<b>73</b>
3.4.1. Bindungsverhalten gegenüber Fibronectin 70 kDa-Fragment.....	73
3.4.2. Bindungsverhalten gegenüber weiteren ECM-Proteinen.....	74
3.4.3. Charakterisierung des Potentials vom Protein GfbI für die Virulenz..	75
3.4.4. Invasivität von Wildtyp und Mutante mittels DIF.....	77
3.4.5. Untersuchungen zur Infektionsmorphologie mittels REM.....	78
3.4.6. Untersuchungen zur Infektionsmorphologie mittels TEM.....	80
3.4.7. Inhibierungsstudien zur Aufklärung des Invasionsmechanismus .....	85
3.4.7.1. Inhibierung der Adhäsion und die Auswirkungen auf die	
Invasion.....	85
3.4.7.2. Modifikation der Membranbeschaffenheit führt zu	
veränderter Adhäsion und Invasion.....	88
3.4.7.3. Inhibierungsstudien zur Klärung des an der Invasion	
beteiligten Zytoskelettes.....	90
3.4.8. DIF-Analysen zur Untersuchung des Verbleibes der GGS in der	
Wirtszelle.....	93
 <b>4. Diskussion.....</b>	<b>97</b>
 <b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>109</b>
 <b>6. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>118</b>

## Zusammenfassung

Streptokokken der Gruppe G sind sowohl tierpathogene, als auch humanpathogene Erreger. Im Menschen verursachen sie ähnliche Krankheitsbilder wie die ausschließlich humanpathogenen Gruppe A Streptokokken. Sie sind verantwortlich für eine Reihe von lokalen und invasiven Rachen- und Hautinfektionen, sowie für die schwerwiegenden Folgeerkrankungen rheumatisches Fieber und Glomerulonephritits. Sie weisen eine Reihe von Virulenzfaktoren auf, welche auch bei Gruppe A Streptokokken beschrieben wurden. Für die Homologien unter diesen Faktoren wird ein horizontaler Gentransfer vermutet.

Beim ersten Schritt zur Etablierung einer Infektion spielen Proteine der extrazellulären Matrix des Wirtes eine entscheidende Rolle für die Adhäsion. Das Potential der einzelnen, bakteriellen Virulenzfaktoren und deren Interaktionen sowohl mit der ECM, als auch mit der Wirtszelle, spielen im weiteren Verlauf des Infektionsprozesses eine wesentliche Rolle.

In dieser Arbeit konnte in radioaktiven Bindungsversuchen ein Stamm (G59) identifiziert werden, welcher eine hohe Bindungsfähigkeit zum 70 kDa-Fragment von humanem Fibronektin aufweist. Dieses Bindungsverhalten ist auch von *S. pyogenes* Isolaten A20 (DSMZ 2071) und A40 bekannt, das entsprechende Protein wurde als SfbI publiziert. Im Southern Blot konnte mit einer Sonde gegen das codierende Gen *sfbI* des Isolates A20 ein *sfbI*-Homolog im Isolat G59 detektiert werden (*gfbI*). Das Isolat G59 konnte ein für die Bindung verantwortliches 70 kDa-Fragment des Fibronektins zu 83% binden. Das Gen *gfbI* wurde sequenziert, in den Überexpressionsvektor pGEX-6P-1 kloniert, überexprimiert und säulenchromatographisch aufgereinigt.

Durch Kopplung des rekombinanten Proteins an Latex Beads konnte gezeigt werden, dass GfbI nicht nur die Adhärenz, sondern über die Ausbildung von Membranfaltungen der Wirtsmembran die Invasion in HEp-2-Epithelzellen vermittelt.

Desweiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *gfbI*-knock-out-Mutante aus dem Isolat G59 generiert. Die Bindungsfähigkeit der Mutante (TF59) für Fibronektin wurde vollständig inhibiert, während die Bindungsfähigkeit an weitere Wirtsproteine wie Fibrinogen, Plasminogen,  $\alpha_2$ -Makroglobulin, Kollagen und Laminin nicht beeinflusst wurde. Die Adhäsion der Mutante im Vergleich zu dem Wildtyp wurde um 50 % reduziert, die Invasion sogar um 63%. Dies zeigt, dass GfbI ein Adhäsion und ein entscheidendes Invasin darstellt. Dennoch war die Mutante in der Lage, an die Epithelzellen zu adhären und diese zu invadieren. Mittels der Elektronenmikroskopie (REM, TEM), als auch mit der Doppelimmunfluoreszenz konnte nachgewiesen werden, dass demnach ein zweiter, GfbI - unabhängiger Invasionsmechanismus existiert.

In der Elektronenmikroskopie wurde die Invasionsmorphologie von Wildtyp (G59) und Mutante (TF59) analysiert. Der Wildtyp G59 wurde zum einen über sogenannte Membranfaltungen von der Zelle aufgenommen. Zum anderen zeigt sich ein weiterer Mechanismus, bei dem die Bakterienkette in die Wirtsmembran einzusinken scheint. Filopodien greifen seitlich und reißverschlußartig über die Bakterienkette und führen so zur Invasion der Bakterien. Ausschließlich der letzte Mechanismus konnte ebenfalls bei der Mutante beobachtet werden.

Eine Blockierung des GfbI-Proteins mittels spezifischer Antikörper im Replattierungsversuch führte zu keiner signifikanten Reduktion der Adhäsion des Wildtyps. Die Invasion desselbigen konnte jedoch auf des Niveau der Mutante reduziert werden. Dies spricht dafür, das GfbI kein entscheidendes Protein für die Adhäsion darstellt, sehr wohl aber entscheidend zum Invasionspotential dieser Gruppe G Streptokokken beiträgt.

Inhibierungsstudien mit RGD-Peptid gaben Aufschluss darüber, dass weder der Wildtyp, noch die Mutante über  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine an die Epithelzellen adhäreren. Die Membranbeschaffenheit und die Funktionalität des Aktinfilamentsystems spielen beim Virulenzpotential sowohl des Wildtyps, als auch der Mutante eine wesentliche Rolle. Dies konnte mittels Inhibierungsstudien mit  $\beta$ -Methyl-Cyclodextrin, Nocodazol, Cytochalasin D und einem Src-Kinase-Inhibitor (Src-PP2) in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Adhäsion wurde bei beiden Isolaten (G59 und TF59) zum Teil deutlich reduziert und die Invasion wurde vollständig inhibiert.

Kolokalisations-Experimente mit spezifischen Antikörpern gegen Kompartimente der Epithelzelle zeigten, dass G59 und TF59 nicht über Invaginationen in die Zellen gelangten. Sie gelangten nicht in Caveosomen und frühen, rezeptorvermittelten Endosomen, sondern waren in Lysosomen zu detektieren. Im Unterschied zum *S. pyogenes* Isolat A40 (SfbI+), welches rezeptorvermittelt ( $\alpha_5\beta_1$ -Integrine) über Invaginationen in die Zelle gelangt, aber nicht in Lysosomen zu finden ist. Dies unterstützt die Beobachtung aus der Transmissionselektronenmikroskopie, dass beide Isolate nach 6h-8h in den Wirtszellen verdaut werden und ihre Zahl insgesamt abnimmt.

Damit konnte in dieser Arbeit ein Fibronectin bindendes Protein GfbI in einem Gruppe G Streptokokken-Isolat identifiziert werden. GfbI konnte als einziges Fibronectin bindendes Protein auf der Oberfläche der Streptokokken identifiziert werden. Es vermittelt sowohl die Adhäsion, als auch die Invasion in humane Epithelzellen. Das Protein GfbI bewirkt auf humanen Epithelzellen (HEp-2) die Ausbildung von Membranfaltungen, die zur Aufnahme der Streptokokken in die Zelle führen. Entscheidend für diesen Prozess ist die Beteiligung des Aktinfilamentsystems.

Es wurde deutlich, dass trotz der Homologien zwischen GfbI und SfbI der Invasionsmechanismus des Gruppe G Streptokokken Isolates G59 völlig anders abläuft, als bei einem SfbI exprimierenden Isolat der Gruppe A Streptokokken.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Gruppe G Streptokokken Isolat G59 über zwei unabhängige Invasionsmechanismen in der Lage ist, humane Epithelzellen (HEp-2-Zellen) zu invadieren.

## 1. Einleitung

### 1.1. Streptokokken der Gruppe G (GGS)

Gruppe G Streptokokken gehören zur Familie der *Streptococceae*. Die ovalen, sporenlosen Kokken sind grampositiv, facultativ anaerob und bilden unterschiedlich lange, unbewegliche Ketten. Auf Blutagar besitzen sie je nach Art  $\beta$ -hämolyisierende oder  $\alpha$ -hämolyisierende Eigenschaften, bilden große ( $> 0.5$  mm; *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) oder kleine ( $< 0.5$  mm; *S. anginosus* (früher *S. milleri*) und *S. canis*) Kolonien, wobei erstere stark den Kolonien der Gruppe A Streptokokken (*S. pyogenes*) ähneln (Oster und Bisno, 2000). Im Gegensatz zu den Gruppe A Streptokokken (GAS) und einigen Gruppe C Streptokokken (GCS) sind GGS unbekapselt (Malke *et al.*, 2000). Eine serologische Abgrenzung zu den anderen Gruppen der Familie *Streptococceae* erfolgt aufgrund des sogenannten Lancefield Antigens, einem gruppenspezifischen, membranständigen, aus Rhamnose und Galactosamin bestehenden Polysaccharid (Lancefield *et al.*, 1933). Diese serologische Einteilung ist nicht konsistent mit der klassischen Taxonomie. Zu den Arten, die das Gruppe G Karbohydrat exprimieren, gehören Isolate von *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. anginosus* und *S. canis* (Facklam *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu den ausschließlich humanpathogenen GAS, kommen GGS sowohl bei Tieren (Rind, Schaf, Katze, Schwein und Hund), als auch beim Menschen vor. Bei letzterem findet man GGS bei 23 % der Bevölkerung als harmlose, asymptomatische Kommensalen auf der Haut, auf der Mucosa des Rachenraumes, des Gastro- und des Urogenitaltraktes (Efstratiou *et al.*, 1997).

### 1.2. Epidemiologie

Seit Mitte der achtziger Jahre wurde weltweit von einer zunehmenden Anzahl schwerer, von Gruppe A Streptokokken verursachten Erkrankungen berichtet (Schlievert *et al.*, 1991). Genauere biochemische und molekularbiologische Untersuchungsmethoden Anfang der Neunziger erlaubten jedoch eine Differenzierung einzelner, an der jeweiligen Krankheit beteiligten Isolate. Von Bedeutung war dies im Hinblick auf die Differenzierung der GGS zu den Gruppe A Streptokokken. Viele Infektionen und Erkrankungen, die zuvor fälschlicherweise Gruppe A Streptokokken zugeschrieben wurden, waren in Wirklichkeit jedoch von Gruppe G Streptokokken verursacht. Der Anstieg der Infektionen mit GGS konnte allerdings nicht nur auf die verbesserten Nachweisverfahren zurückgeführt werden, sondern unabhängig davon kam es Mitte der Neunziger Jahre zu immer häufigeren Infektionen mit Gruppe G Streptokokken (Efstratiou *et al.*, 1997; Oster und Bisno, 2000). Dies zeigt deutlich die zunehmende Involvierung dieser Bakterien bei humanen Infektionen und die Notwendigkeit, sie als humanpathogene Erreger in stärkerem Maße ernst zu nehmen.



### 1.3. Krankheitsbilder

Gruppe G Streptokokken spielen bei einer Vielzahl humaner Erkrankungen eine Rolle. Das Spektrum an Krankheitsbildern ist vergleichbar mit dem von Gruppe A Streptokokken. Überwiegend werden sie aus Rachen- und immer häufiger auch aus Wund-Infektionen, sowie aus dem Blut isoliert und ihre Zahl ist im Vergleich zu den von Gruppe A Streptokokken verursachten Infektionen steigend. GGS sind verantwortlich für relativ harmlose primäre Erkrankungen wie Tonsillitis, Sinusitis und Pharyngitis aber auch für schwerwiegende sekundäre Infektionen. Dazu gehören Wundinfektionen von Brandopfern und Patienten mit chronischen Ulcera, Infektionen an Einstichstellen von Drogenkonsumenten, postoperative Wundinfektionen und neonatale Infektionen (Oster und Bisno, 2000; Efstratiou *et al.*, 1997;) sowie Erysipel und Pyoderma (Nohlgard *et al.*, 1992). Die Invasion in tiefergelegenes Gewebe erfolgt bei diesen Erkrankungen hauptsächlich über die Haut ( 64,9% Liu *et al.*, 1995; Oster und Bisno, 2000; Efstratiou *et al.*, 1997). Ältere Menschen und Patienten mit schweren Grunderkrankungen wie Krebs, Diabetes mellitus, Alkoholmißbrauch, neurologische Erkrankungen, chronischen Erkrankungen aller Art, kardiovaskulären Erkrankungen sowie Immunsuppression können zusätzlich schwere Infektionen entwickeln. Hierzu zählen Bakteriämien, Meningitis (Mohan, 1989), entzündliche Arthritis (Fischetti *et al.*, 2000; Jansen *et al.*, 1998; Nakata *et al.*, 1983), Endokarditis (Oster und Bisno, 2000), Cellulitis (Bisno *et al.*, 1997) und Lungenentzündung (Malke *et al.*, 2000). Neben dem teilweise lethalen Ausgang solcher Infektionen ist das Toxische-Schock-Syndrom („toxic shock like syndrome“, TSLS) als ein weiteres, lebensbedrohliches Krankheitsbild beschrieben (Hirose *et al.*, 1997). Die Benennung dieses Syndroms erfolgte aufgrund der ähnlichen klinischen Manifestationen in Anlehnung an das Toxische-Shock-Syndrom, welches für *Staphylococcus aureus* beschrieben ist (Stevens *et al.*, 1989). Symptome des TSLS sind Bakteriämie, Hypertension, Tachykardie, hohes Fieber, Tachypnoe sowie Multi-Organversagen. Diese Krankheit führt in 30 % aller Fälle trotz aggressiver Therapie in kürzester Zeit zum Tod. Ebenso schwerwiegend wie der Verlauf dieser Erkrankungen ist die Entwicklung von Spätfolgen nach einer Infektion mit Gruppe G Streptokokken. Sie entwickeln sich oftmals Wochen bis Monate nach einer harmlosen, bzw. einer mit Antibiotika unzureichend behandelten Infektion und treffen im Gegensatz zu den oben aufgeführten Patientengruppen auch jüngere Patienten ohne Vorbelastung. Bei den Spätfolgen handelt es sich um Glomerulonephritis (Reid *et al.*, 1985; Gnann *et al.*, 1987; Casadevall *et al.*, 1992; Holm *et al.*, 1988) und inflammatorische Autoimmunkrankheiten wie das Akute-Rheumatische-Fieber (ARF) und chronische Herzerkrankungen (RHD). Vor allem Kinder aus medizinisch unterversorgten Regionen sind hiervon betroffen. Die Rate an ARF ist besonders hoch bei Kindern aus Südafrika, den Aborigines des Northern Territory, Australien, den samoanischen Kindern, Hawaii, den Maori, Neuseeland, und den Kindern aus Sri Lanka (Stollermann *et al.*, 1997) sowie bei Kindern aus Nordindien (Kaur *et al.*, 1998). Betroffen sein können Haut (Erythema marginatum), Nervensystem (Sydenhams Chorea), Gelenke (Arthritis) und im Fall des RHD auch der Herzmuskel (Myokarditis) und die Herzklappen. Der Mechanismus, der zur Entstehung von rheumatischem Fieber führt ist bisher unbekannt. Für die Pathogenese der Myokarditis bei Gruppe A Streptokokken werden Antikörper gegen das M-Protein verantwortlich gemacht, die mit

dem menschlichen Herzmyosins kreuzreagieren (Cunningham *et al.*, 2000). Für die Pathogenese von Rheumatischem Fieber wurden in der Vergangenheit ausnahmslos Gruppe A Streptokokken verantwortlich gemacht. Jedoch ist die Verbreitung der von GAS verursachten Pharyngitis in der Region mit dem weltweit höchsten Anteil an rheumatischem Fieber bei Kindern, dem Northern Territory in Australien, eher gering. Ein Drittel aller ARF-Fälle wurde negativ auf Gruppe A Streptokokken getestet, dafür fand man in den Rachenisolaten ausschließlich Streptokokken der Gruppe C und G. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die nach Immunisierung gebildeten Antikörper gegen diese Isolate *in vitro* mit Herzmyosin reagieren. Somit könnten die Isolate, bzw. das Protein SfbI für die Entwicklung von rheumatischem Fieber und der rheumatischen Herzkrankheit verantwortlich sein (Haidan *et al.*, 2000).

#### **1.4. Virulenzfaktoren von Gruppe G Streptokokken**

Eine Vielzahl von Virulenzfaktoren sind bei Gruppe G Streptokokken bereits identifiziert worden. Es handelt sich dabei um membranständige Oberflächenproteine und zum Teil sezernierte Proteine und Enzyme. Das Wechsel- und Zusammenspiel dieser Proteine führt zur Adhäsion und Kolonisierung des Wirtes, sowie zur Vermehrung und Verbreitung der Erreger im Gewebe, als auch zur Ausprägung eines charakteristischen Krankheitsbildes.

Viele der Virulenzfaktoren weisen hohe Sequenz- und Funktionshomologien zu den Virulenzfaktoren der Gruppe A Streptokokken auf. Molekularbiologische Analysen ergaben, dass ein horizontaler Gentransfer bidirektional möglich ist (Sachse *et al.*, 2002), jedoch der Transfer von den GAS zu den GGS wesentlich häufiger auftritt als andersherum (Kalia *et al.*, 2003).

#### **Virulenzfaktoren zur Adhäsion und Kolonisation des Wirtes**

Für die Adhäsion und Kolonisierung des Wirts ist die Bindung an Wirtszellen direkt, bzw. über Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) der erste entscheidende Schritt zur Etablierung einer Infektion.

Das Glykoprotein Fibronectin ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix und kommt sowohl in fester Form im Gewebe, als auch in löslicher Form auf der Mukosa von Epithelzellen vor, sowie in den Thrombi frischer Wunden und ist somit für die Bakterien leicht zugänglich. Als Multifunktionsprotein mit Bindungsstellen für Kollagen (Dinkla *et al.*, 2004) und Fibrinogen ist es ein wichtiges, die Adhäsion und Kolonisation vermittelndes Protein. Für GAS und GCS ist eine Vielzahl von Fibronectin-Bindungsproteinen bekannt. Charakterisiert wurden für Gruppe A Streptokokken die Proteine SfbI (Talay *et al.*, 1992), das F1-Protein (Hanski *et al.*, 1992), sowie die Proteine F2 (Jaffe *et al.*, 1996), Fba (Terao *et al.*, 2001), M3 (Schmidt *et al.*, 1993), M1

(Cue *et al.*, 1998) und FBP54 (Courtney *et al.*, 1994). Für Gruppe C Streptokokken sind bekannt FnBA (SfbII Homolog) und FnBB (F2 Homolog) von *S. dysgalactiae* (Lindgren *et al.*, 1993), FNZ der *S. equi subsp. zooepidemicus* (Lindmark, 1996), sowie FnB (FNZ Homolog, truncated) von *S. equisimilis* (Lindgren *et al.*, 1994). Für Gruppe G Streptokokken ist bis heute jedoch nur das Protein GfbA (SfbI, PrtF Homolog) bekannt (Kline *et al.*, 1996).

Kollagen ist Hauptbestandteil der Basallamina und für *S. equi* und *S. zooepidemicus* wurden Kollagen-Bindungsproteine beschrieben, eines davon CNE (Lannergard, 2003), ein Homolog zu dem Kollagen bindenden Protein CNA aus *S. aureus*, und ein weiteres mit Bindung an Kollagen des Typ II (Visai *et al.*, 1995).

Auch wurde die Bindung an Plasminogen über M-ähnliche Proteine (Ben-Nasr *et al.*, 1994 ) und über die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gase *et al.*, 1996) beschrieben.

Bindungsstellen für humanes Serum Albumin und für  $\alpha_2$ -Macroglobulin führen in tieferem Gewebe, bzw. im Blut zu weiteren Interaktionen mit dem Wirt (Chhatwal *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass GGS in der Lage sind, an Vitronektin zu binden (Chhatwal *et al.*, 1987) und so die Adhäsion an Epithel- und Endothelzellen zu vermitteln (Filippsen *et al.*, 1990). Vitronektin ist ein Serumprotein, welches die Blutgerinnung reguliert und durch Bindung an den Komplement-Membran-Attack-Komplex die Immunantwort des Wirtes inhibiert (Preissner *et al.*, 1991).

### **Virulenzfaktoren (Enzyme) für die Verbreitung der Bakterien im Gewebe**

Die Expression von Exoenzymen ermöglicht die Verbreitung der Bakterien im Gewebe. Diese Enzyme sind sowohl bei GAS, als auch bei GGS bekannt und charakterisiert. Bakterielle **Streptokinase** bildet mit humanem Plasminogen einen Komplex, der das freie Plasminogen in die aktive Enzymform Plasmin (Fibrinolysin) überführt (Tillit *et al.*, 1934; Bajaj *et al.*, 1977; Wheeler *et al.*, 1992, Walter *et al.*, 1989b). Die so erlangte fibrinolytische Eigenschaft sorgt für eine höhere Durchlässigkeit des Gewebes, welches somit für die Bakterien von Vorteil ist. M-Proteine binden ebenfalls an Plasminogen und Fibrinogen. Durch diese Rekrutierung von Plasminogen und Fibrinogen an die Bakterienoberfläche erhöht sich die Effizienz der von den Bakterien sezernierten Streptokinase. **Desoxyribonucleasen** zersetzen in eitrigen Infektionen die DNA und verringern so die Viskosität der Wundsekrete (Reitmeyer *et al.*, 1990). **Hauskeeping Enzyme** (Enolase und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) (Gase *et al.*, 1996) stellen weitere wichtige Virulenzfaktoren dar. Diese werden nicht nur auf der Zelloberfläche präsentiert, sondern können nach Sekretion an die Membran reassoziieren. Dort können sie ebenfalls mit Fibrinogen, Plasminogen und der Wirtszelle direkt interagieren. Die direkte Interaktion mit der Wirtszelle führt zu einer modifizierten Signaltransduktion der Zelle, welche die Ausbreitung und das Überleben der Bakterien begünstigt. (Pancholi und Chhatwal, 2003).

## Virulenzfaktoren zur Abwehr des wirtseigenen Immunsystems

Nach der Kolonisierung des Wirtes ist eine erfolgreiche Umgehung der wirtseigenen Immunabwehr für die Ausbreitung der Infektion unerlässlich. Zum einen sorgt die Bindung an wirtseigene Proteine dafür, dass die Bakterien nicht sofort als „fremd“ erkannt werden, zum anderen exprimieren GGS Proteine und Enzyme, welche direkten Einfluß auf die Immunantwort des Wirtes nehmen und eine Phagozytose verhindern können. Wie auch für GAS beschrieben (*scpA*) besitzen humane GGS Isolate ein Gen (*scpG*), welches für eine **C5a-Peptidase** codiert. Die C5a Peptidase inhibiert die Komplementkaskade, indem sie durch Proteolyse das Chemotaxin C5a (Anaphylatoxin) inaktiviert. Dadurch wird die Chemotaxis von polymorphkernigen Leukozyten zum Infektionsherd vermindert (Wexler, 1985; Cleary, 1991). Durch die hohe Homologie der C5a-Peptidasen-Gene aus GAS und GGS, aber deren völlig unterschiedliche Gen-loci, wird der Austausch dieser Gene über horizontalen Gentransfer vermutet (Franken *et al.*, 2001).

Allein die Bindung von **Fibrinogen** an die Streptokokken verhindert die Anlagerung des Komplementproteins C3b und schützt so vor Phagozytose (Chhatwal *et al.*, 1985; Chhatwal *et al.*, 1986).

## M-Protein

Ein wichtiges Protein, welches bei den GAS zu den Hauptvirulenzfaktoren mit antiphagocytotischer Wirkung zählt (Fischetti *et al.*, 1989) und auch bei den humanen Isolaten GGS vorkommt, ist das M-Protein. **M-Proteine** humaner GGS sind fibrilläre, coiled-coil-Proteine auf der Außenseite der Bakterienoberfläche, und weisen vor allem große Ähnlichkeiten zur C-terminalen Repeat-Region der Klasse I M-Proteine von Gruppe A Streptokokken auf. Diese werden mit der Ausbildung von rheumatischem Fieber assoziiert (Collins *et al.*, 1992). M-Proteine der GGS aus Tieren weisen diese Sequenzhomologien nicht auf, sehr wohl aber funktionell ähnliche Eigenschaften (Schnitzler *et al.*, 1995). MG1 war das erste M-ähnliche Protein bei GGS, welches molekular beschrieben wurde (Collins *et al.*, 1992). Ein weiteres M-ähnliches Protein, welches für *S. dysgalactiae* beschrieben wurde, ist das DemA (Vasi *et al.*, 2000). Ein Homolog findet sich bei *S. equi* als FgBP (Vasi *et al.*, 2000) und ein weiteres M-ähnliches Protein bei *S. equi* ist das SzP-Protein, welches jedoch kaum Ähnlichkeit zu FgBP aufweist (Timoney *et al.*, 1997). Die Fähigkeit der M-Proteine an Fibrinogen und Plasminogen zu binden, wurde bereits erwähnt.

Untersuchungen zur antiphagocytotischen Wirkung zeigten, dass nur 50% der Isolate von oberflächlichen, harmlosen Erkrankungen (avirulente Stämme) gegen Phagozytose resistent waren. Im Gegensatz dazu zeigten nahezu alle Isolate von schweren invasiven Erkrankungen (virulente Stämme) Resistenz gegen Phagozytose und vermehrten sich im Blut (Efstratiou *et al.*, 1987; Reitmeyer *et al.*, 1990). Die Mechanismen zur Verhinderung der Phagozytose sind sehr komplex und verschiedene Erklärungsansätze werden noch diskutiert. Unter anderem, dass die Bindung der M-Proteine an Fibrinogen und an den Regulator der Komplement-Kaskade (Faktor H) die Opsonisierung über die alternative Aktivierung des Komplementsystems verhindert (Horstmann *et al.*, 1992;

Fischetti *et al.*, 1995). Vorstellbar ist auch, dass Fibrinogen, welches an M-Protein gebunden ist, an den iC3b-Rezeptor der Phagozyten bindet und so die Phagozytose inhibiert (Campo *et al.*, 1995). Die Bindung an Fibrinogen könnte auch die Anlagerung des Komplementfaktors C3b an die Oberfläche der Streptokokken und somit die Aktivierung des alternativen Komplement-Pathways verhindern (Chhatwal *et al.*, 1985). Im Gegensatz zu Infektionen mit *S. pyogenes* akquirieren mit GGS infizierte Mäuse keine protektive Immunität oder weisen opsonisierende Antikörper auf. Auch ist die Sequenzhomologie humaner GGS zu *S. pyogenes* (GAS) größer, als die der M-ähnlichen Proteine aus Tier-Isolaten. Ein Grund hierfür könnte wiederum ein horizontaler Gentransfer sein (Schnitzler *et al.*, 1995; Vasi *et al.*, 2000).

### **IgG-bindende Proteine**

Zur Abwehr der wirtseigenen Immunantwort gehören auch Proteine, die unspezifisch an die Immunglobuline des Wirtes binden. Hier werden überwiegend IgGs der Klassen 1-4 gebunden. Auf diese Art und Weise greifen die Bakterien direkt in die Immunantwort ein und schalten eine Detektion durch den Wirt und die daraus resultierenden Folgen der Eliminierung aus. Auffällig ist, dass die meisten membranständigen Proteine darüber hinaus noch andere Bindungsfunktionen erfüllen, und die Bindung an IgG eher eine assoziierte denn eine ursprüngliche Funktion ist. Das Bindungspotential zur Bindung von Immunglobulinen hängt sowohl von der Quelle des Isolates, als auch von der damit verbundenen Krankheit ab und kann auch innerhalb einer Streptokokken-Gruppe variieren (Schmidt *et al.*, 1987). Insgesamt ist eine höhere Bindung von IgG an GGS beobachtet worden, als an Gruppe A Streptokokken (Myhre und Kronvall, 1977). Eines der wichtigsten und am stärksten bindenden Proteine ist das **Protein G**.

Protein G ist das Haupt-Immunglobulin-Bindungs-Molekül der Streptokokken Gruppe C und G und ist vergleichbar mit dem Protein A von *Staphylococcus aureus* (Malke *et al.*, 2000). Die Bindungsfähigkeit des Protein G an IgG ist jedoch weitaus stärker als beim Protein A, ein Grund, warum Protein G häufiger als Protein A als Säulenmaterial bei der säulenchromatischen Aufreinigung von IgGs verwendet wird. Es bindet im Gegensatz zu Protein A IgG-Moleküle fast aller Spezies, da es an die konstante Region der schweren Kette von Fc- und F(ab)-Fragmenten bindet und weil diese und die CH1-Domäne der F(ab)-Fragmente hochkonserviert ist. Desweiteren besitzt es Bindungsdomänen für humanes Albumin, Kininogen und die native slow-Form des  $\alpha_2$ -Macroglobulins (Muller *et al.*, 1995; Navarre *et al.*, 1999; Sjöbring *et al.*, 1991). Die Protein G Analoga MIG und MAG aus den Tier-Isolaten *S. dysgalactiae* und ZAG aus *S. zooepidemicus* unterscheiden sich nur geringfügig in ihren Bindungseigenschaften vom Protein G. Der wesentliche Unterschied ist jedoch die Bindung an die aktivierte fast-Form des  $\alpha_2$ -Macroglobulins. Für MIG konnte gezeigt werden, dass diese Bindung der Bakterien an die aktivierte fast-Form des  $\alpha_2$ -Macroglobulins ähnlich wie Fibrinogen die Phagocytose von PMNs inhibieren kann (Valentin-Weigand *et al.*, 1990).

Weitere IgG-bindende Proteine sind das für GAS beschriebene **SfbI-Protein** von *Streptococcus pyogenes* (Medina *et al.*, 2000) und M-ähnlicher Proteine (Schalen *et al.*, 1983; Raeder *et al.*, 1998; Fluckiger *et al.*, 1998). Interessant sind in diesem

Zusammenhang Untersuchungen, welche ergaben, dass posttranslationale Modifikationen des M-Proteins aus GAS einen direkten Einfluß auf das Ausmaß der IgG-Bindung haben. Raeder *et al.* (1998) konnten zeigen, dass die sezernierte Cystein-Protease (SpeB) der GAS das M-Protein vom Serotyp M1 schneidet, was das Bindungspotential dieses Proteins von den IgGs aller vier Subklassen zu den IgGs ausschließlich der Klasse 3 verschiebt.

Desweiteren korreliert die Virulenz eines Stammes mit der Expression IgG-bindender Proteine (Raeder *et al.*, 1993). Zu erwähnen sei auch das FAI-Protein aus GCS. Dieses Protein bindet neben Fibrinogen und Albumin auch IgG (Talay *et al.*, 1996).

### **Virulenzfaktoren (Toxine)**

Für die Ausbildung bestimmter Krankheitsbilder werden sekretierte Toxine verantwortlich gemacht.

Superantigen (SAGs)-Toxine binden unspezifisch an die Moleküle des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex II der antigenpräsentierenden Zellen und an die Rezeptoren der T-Zellen. Dadurch werden große Mengen an Cytokinen freigesetzt. Diese spielen eine große Rolle bei der Entwicklung von den für das Toxische-Schock-Syndrom beschriebenen Symptomen wie Fieber, Schock, Bluthochdruck und Organversagen während einer schweren Streptokokken-Infektion. Antikörper gegen die Superantigene speL- und speM der GAS, die aus Patienten mit akutem rheumatischem Fieber isoliert wurden, geben Hinweis darauf, dass die Superantigene bei der Ausbildung von ARF eine Rolle spielen könnten (Smoot *et al.*, 2002, Proft *et al.*, 2003). Die meisten Sag-Gene sind auf integrierten Phagengenomen lokalisiert (Igwe *et al.*, 2003). Dies fördert vermutlich den genetischen Transfer zwischen den einzelnen Streptokokken-Spezies. Aus Gruppe G Streptokokken sind die aus GAS bekannten pyrogenen Exotoxine speA, speC und speG identifiziert (Kalia *et al.*, 2003; Sachse *et al.*, 2002) – sowie die Gene für speM, ssa und smeZ (Igwe *et al.*, 2003).

**Streptolysin O** gehört zur Familie der Thiol-aktivierten Cytolysine, welche mit dem Cholesterol der Zellmembran interagieren. Laterale Diffusion der gebundenen Monomere in der Zellmembran führt zur Aggregation und zur Entstehung ringförmiger Poren. Der Durchfluss von Ionen und Makromolekülen führt zur Lyse der Zelle. Streptolysin O ist häufig an nekrotisierenden Gewebeinfektionen beteiligt. Zusätzlich ist es in der Lage, die entzündliche Immunantwort über Cytokine zu beeinflussen und ist daher ein weiterer Faktor im Entzündungsgeschehen (Billington *et al.*, 2000; Stassen *et al.*, 2003).

### 1.5. SfbI – Fibronectin Bindungsprotein von Gruppe A Streptokokken

SfbI ist als Fibronectin-Bindungsprotein für *S. pyogenes* beschrieben worden (Talay *et al.*, 1991). Es gilt als eines der Hauptadhäsine, ist als Invasin humaner Epithelzellen charakterisiert worden und kommt bei 73% der klinischen GAS Isolate vor. Mit Hilfe dieses Proteins binden GAS an Fibronectin, welches über seine Arg-Gly-Asp (RGD) Sequenzrepeats an die  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine der Epithelzelloberfläche binden kann (Pierschbacher und Rouslathi, 1984) und somit die Adhärenz der Streptokokken an die Epithelzelle vermittelt (Hanski *et al.*, 1992; Valentin-Weigand *et al.*, 1994).

SfbI besteht aus einer variablen aromatischen Region, vier prolinreichen Repeats, welche durch zwei Spacer begrenzt werden. Auf den Fibronectin bindenden Spacer2, folgen vier Repeats von je 37 Aminosäuren, welche Fibronectin binden, in ihrer Anzahl jedoch innerhalb der Stämme variabel sind. Die Sequenzen der Prolinrepeats sind hochkonserviert. Über einen Membrananker ist dieses Protein in der Zellwand verankert.

Die höchsten Homologien von SfbI bestehen zu den Fibronectin bindenden Proteinen PrtF (F1) (Hanski *et al.*, 1992); FBP54 (Courtney *et al.*, 1994) und GfbA (Kline *et al.*, 1996), vor allem in den konservierten Regionen der Fibronectin Bindungsdomänen.

Die Bindung an Fibronectin erfolgt kooperativ. Zunächst binden die FBR (Fibronectin bindende Repeats) an das 30 kDa Fragment von Fibronectin. Dadurch kommt es vermutlich zu einer Konformationsänderung des SfbI Proteins, welche eine Bindung des Spacers an das 45 kDa Fragment von Fibronectin ermöglicht. Die Bindung an die Integrine bewirkt möglicherweise die Modifikation der zellulären Signaltransduktion, und könnte somit für eine effiziente Invasion der Bakterien in die Epithelzelle von Bedeutung sein (Molinari *et al.*, 1997; Talay *et al.*, 2000). Für eine erfolgreiche Adhäsion und Invasion ist die Bindung des SfbI an ein 70 kDa großes Fragment des Fibronectins ausreichend. Dieses Fragment beinhaltet die Gelatine bindende Region, sowie die N-terminale Fibrin-Bindungssequenz. Auch Kollagen wird über dieses Fragment gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass *S. pyogenes* Isolate in der Lage sind, über das SfbI Protein Fibronectin zu binden und über dessen Kollagen-Bindungsdomäne Kollagen zu rekrutieren. Dadurch waren die Bakterien in der Lage, Kollagenfasern (TypVI) zu kolonisieren. Die Bakterien waren desweiteren durch die sukzessive Bindung von Fibronectin und Kollagen vor Phagocytose durch polymorphkernige Leukozyten geschützt (Dinkla *et al.*, 2003).

Charakteristisch für den SfbI vermittelten Invasionsmechanismus von GAS sind Membraneinstülpungen. Diese sogenannten Invaginationen bilden die Kompartimente, welche die Streptokokken anschließend intrazellulär umschließenden. Es konnte gezeigt werden, dass Caveolin-1 ein Bestandteil in der Membran dieser Invaginationen (Caveosomen) ist, die an der Kontaktstelle von Bakterien und Zellmembran entstehen. Selbst rekombinantes SfbI-Protein allein ist in der Lage, bei HUVEC-Zellen diese Akkumulation von Caveolin-1 und die Invaginationen zu bewirken (Rohde *et al.*, 2003).

SfbI ist somit verantwortlich für einen Caveosomen-vermittelten Invasionsmechanismus der GAS.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das Protein SfbI einen geeigneten Impfstoffkandidaten darstellen könnte, da 80% der Mäuse, die mit rekombinantem SfbI immunisiert wurden, protektive Antikörper entwickelten (Guzman *et al.*, 1999). Verantwortlich hierfür waren die Fibronectin bindenden Repeats und der Fibronectin bindende Spacer2 (Schulz *et al.*, 2001). Eine weitere Eigenschaft dieses Proteins beruht auf der Bindungsfähigkeit von Fc- und F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten der vier IgG-Klassen (Medina *et al.*, 2000). SfbI kann auch unspezifisch in einer nicht immunogenen -Bindung die IgGs von Mäusen, Kaninchen, Schweinen und Pferden binden. Darüber hinaus konnten Medina *et al.* (1999) zeigen, dass SfbI sich als Adjuvans eignet, da es spezifisch an B-Zellen bindet und deren Aktivierung bewirkt, sowie die Präsentation der MHC KlasseII-Moleküle auf APCs (Antigen präsentierenden Zellen) verstärkt. Bedeutung erlangt auch die Tatsache, dass SfbI-Moleküle, nach der Invagination der Bakterien, durch das Cytoplasma aus der Zelle ausgeschleust werden. Es wird vermutet, dass das Protein auf die Art extrazellulär seine zweite Funktion erfüllt und weitere IgG-Moleküle abfängt (Talay *et al.*; unpubliziert)

### 1.6. GfbA – Fibronectin Bindungsprotein von Gruppe G Streptokokken

GfbA besteht wie SfbI aus einer aromatischen Region, und enthält vier durch zwei Spacer flankierte prolinreiche Repeats. Auf den Fibronectin bindenden Spacer2 folgen jedoch im Gegensatz zu SfbI nur drei Fibronectin bindende Repeats. Ein Membrananker verankert dieses Protein in der Zellwand.

GfbA weist hohe Sequenzhomologien zu den Fibronectin-Bindungsproteinen SfbI und PrtF1 der Gruppe A Streptokokken auf, hier vor allem auch zu den Fibronectin bindenden Repeats. Es wurde in unabhängigen Experimenten gezeigt, dass GfbA-exprimierende Stämme sowohl an lösliches, radioaktiv-gelabeltes Fibronectin binden, als auch an humane Hautfibroblasten. Beide Bindungen konnten durch Vorinkubation mit Fibronectin unterbunden werden, was das Protein auf indirektem Weg als Fibronectin-Bindungsprotein und als Adhäsion klassifiziert. Ein GfbA negativer Stamm zeigte wieder den Phänotyp des Wildtyp-Stammes, nachdem das *gfbA*-Gen in diesen Stamm transformiert wurde (Kline *et al.*, 1996). Insgesamt wiesen nur 36 % der untersuchten, adhärenen Stämme ein GfbA-Homolog auf. Dies bedeutet, dass es noch weitere Oberflächenproteine der GGS gibt, welche eine Adhäsion an humane Hautfibroblasten vermitteln (Kline *et al.*, 1996).



### 1.7. Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte das Fibronectin vermittelte Adhäsions- und Invasionsverhalten von Gruppe G Streptokokken untersucht werden.

Dazu sollten verschiedene Stämme auf ihre Fibronectin-Bindungseigenschaften untersucht und das entsprechende Bindungsprotein identifiziert werden. Dieses sollte für weitere Untersuchungen zunächst kloniert und als rekombinantes Protein für biochemische und zellbiologische Untersuchungen exprimiert und aufgereinigt werden. Die Generierung einer Knock-out Mutante sollte im Vergleich zum Wildtyp die Bedeutung dieses Proteins im Wechsel- und Zusammenspiel der verschiedenen Oberflächenproteine während der Infektion verdeutlichen. Es galt den Infektionsverlauf, die Auswirkungen auf die Zellmorphologie und den Verbleib der Bakterien mit Hilfe bildgebender Verfahren wie der Immunfluoreszenz, der Raster- und Transmissions-Elektronenmikroskopie, darzustellen. Das Potential hinsichtlich Adhäsion und Invasion sollte mit Hilfe von Infektions- und Inhibierungsstudien im Vergleich Wildtyp/Mutante untersucht werden. Diese Studien sollten auch dazu beitragen, den Einfluss von intrazellulären Strukturen auf diesen Prozess, wie die Organisation des Aktinfilamentsystems, die Rolle von Mikrotubuli und der Signaltransduktion, aufzuklären.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendete Bakterienstämme

<u>Bakterien-Stämme</u>		<u>AB-Konzentration</u>	<u>Herkunft</u>
<i>E.coli</i>			
HB101		Amp100; Sm50	Pharmacia
DH5α		-	Biolab
TOP10		Amp100	Invitrogen
<b>Streptokokken Gruppe C</b>	<u>Bez.-Nr. Stammsammlung GBF</u>	<u>hum. Isolate</u>	
C16	84-53208	Rachen	Australien
C62	2-99B	Rachen	Australien
C64	2-99B	Rachen	Australien
C79	52-99A	Rachen	Australien
<b>Streptokokken Gruppe G</b>			
G29	Nr.G29	Rachen	Australien
G30	Nr.G30	Rachen	Australien
G31	Nr.31-(74)99B	Rachen	Australien
G32	Nr.32-(74)99C	Rachen	Australien
G33	Nr.33-(82)99B	Rachen	Australien
G48	Nr.36-(48G)	Rachen	Australien
G59	Nr.37-(59G)	Rachen	Australien
<b>Streptokokken Gruppe A</b>		<b>Infektion</b>	
A8	GBF, 48226	nicht invasiv	Deutschl., Aachen
A20	DSMZ 2071	invasiv	Deutschl., Braunschweig
A40	BS 20	nicht invasiv	Deutschl., Braunschweig

Die Bakterienisolate C16 und G59 wurden auf ihre physiologischen, phänotypischen und katabolischen Eigenschaften in der DSMZ untersucht. Die Typisierung des C16 ergab 97.2% Ähnlichkeit zu *Streptococcus equi*, während G59 mit 96.8% eher zur Gattung *Streptococcus dysgalactiae* zählt.

### 2.1.1. Kulturmedien für Bakterien

#### **Luria-Bertani (LB)**, Sambrook *et al.*, (1989)

Bacto Trypton	10	g
Bacto Yeast Extrakt	5	g
NaCl	10	g
Für feste Medien wurden 18 g/l Agar zugegeben		
dH <sub>2</sub> O	1000	ml

#### **Todd Hewitt Broth (THB)**, Todd/Hewitt, (1932)

Todd-Medium-Powder	36.4	g
dH <sub>2</sub> O	1000	ml

#### **Todd Hewitt Yeast (THY)**, Todd/Hewitt, (1932)

Todd-Medium-Powder	36.4	g
Bacto Yeast Extract	10	g
dH <sub>2</sub> O	1000	ml

#### **Tryptone Soy Broth (TSB)**, U.S. Pharmacopeia, 21. edition, (1985)

TSB-Medium-Powder	30	g
dH <sub>2</sub> O	1000	ml

#### **TSS-Medium (nach Chung *et al.*, 1989)**

Bacto-Tryptone	2.5	g
Bacto-Yeast-Extrakt	1.25	g
NaCl	1.25	g
PEG 3000	25	g
dH <sub>2</sub> O	225	ml
autoklavieren		

Erst bei Verwendung zugeben:

DMSO	12.5 ml
MgCl <sub>2</sub> (1M)	12.5 ml

### 2.1.2. Kultivierung und Erhalt der Bakterien

Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium, gegebenenfalls unter Zusatz von Antibiotikum, über Nacht bei 37°C unter Schütteln.

Die Kultivierung von Streptokokken erfolgte in Todd-Hewitt Broth ohne Schütteln in 15 ml Falconröhrchen bei 37 °C, gegebenenfalls unter Zusatz von Antibiotika. Als Festmedium wurden Blutagar-Platten (Columbia-Agar mit 5 % Schafsblut, Becton-Dickinson) verwendet. Lagerung erfolgte für maximal 14 Tage bei 4°C.

## 2.2. Eukaryontische Zellen

### 2.2.1. Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Referenz
HEp-2	humane Rachenepithelzellen	ATCC CCL-23
A549	humane Lungenepithelzellen	ATCC CLL-185

### 2.2.2. Medien für die Zellkultur

#### Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Zusätze:	+ 10%	FCS (hitzeinaktiviert)
	+ 1%	Penicillin/ Streptomycin (Stock: Penicillin 5000 U/ml, Streptomycin 5000 µg/ml)
	+ 1%	L-Glutamin (Stock: 30 g/l)
	+	Natriumpyruvat, Pyridoxin und 1000 mg/l Glucose

#### HEPES-Medium (Infektionsmedium)

DMEM mit HEPES (25 mM) gepuffert

Zusatz:	+ 1%	FCS
---------	------	-----

**DMEM-Medium zur Infektionsvorbereitung**

Zusätze:           + 1% L-Glutamin (Stock: 30 g/l)  
                  + 10% FCS hitzeinaktiviert; für Inhibierungsassays (2.9.5.) nur mit  
                                  1% FCS

**2.2.3. Anzucht und Kultivierung der Zellen**

Die Anzucht der HEP-2-Zellen erfolgte in 20 ml DMEM bei 37°C in einer 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im CO<sub>2</sub>-Inkubator (FORMA SCIENTIFIC). Zur Passage wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin-EDTA inkubiert und die Reaktion mit 5 ml DMEM-Medium gestoppt. 2.5 ml dieser Zellsuspension wurden in eine neue Petrischale mit 17.5 ml DMEM-Medium überführt und für 2 Tage kultiviert.

Bei Invasionsversuchen wurden die Zellen nach Auszählung in einer Thoma-Zählkammer mit einer Zellzahl von  $7.5 \times 10^4$  Zellen/Well einer „24-er Well-Platte“ (NUNC) ausgesät. Für die Doppelimmunfluoreszenz wurden die Wells vorher mit einem Deckgläschen (Ø10mm) bestückt. Die Anzucht erfolgte über Nacht.

**2.3. Antikörper****Antikörper / Seren / Proteine****Hersteller/Referenz**

Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Maus Ig	Jackson Laboratories
Transferrin-Alexa488	Mol. Probes.

Die Antikörper antiSfbI und antiGfbI wurden aus den von der Firma Eurogentec generierten Seren über eine Protein-A-Säule (Amersham Bioscience) chromatographisch aufgereinigt (s.2.8.5.).

**Tab. 1 :** Verwendete Antikörper und ihre eingesetzten Verdünnungen. mAb. = monoklonaler Antikörper; pAb. = polyklonaler Antikörper.

<b><u>Erst-Antikörper</u></b>				
<b><u>Antikörper</u></b>	<b><u>Konzentration</u></b>	<b><u>Herkunft</u></b>	<b><u>Verdünnung</u></b>	<b><u>Herkunft/Referenz</u></b>
anti-SfbI (SerumA173)	8.3 mg/ml	pAb. Kaninchen	1 : 50	Dr. S. Talay, GBF
anti-GfbI	8.12 mg/ml	pAb. Kaninchen	1 : 20	diese Arbeit
anti-Lamp1 (CD107A)	0.5 mg/ml	mAb. Maus	1:25	Mol. Probes
anti-Clathrin	1 mg/ml	mAb. Maus	1:50	Mol. Probes
anti-GfbIspz		pAb. Kaninchen	1 : 20	diese Arbeit
anti- C16		pAb. Kaninchen	1 : 20	Dr. A. Haidan, GBF
anti- G59		pAb. Kaninchen	1 : 20	Dr. A. Haidan, GBF
anti- A40		pAb. Kaninchen	1 : 50	Dr. G. Molinari, GBF
anti- A20		pAb. Kaninchen	1 : 50	Dr. S. Talay, GBF
anti- A8		pAb. Kaninchen	1 : 50	Dr. G..Molinari, GBF
<b><u>Zweit-Antikörper</u></b>				
<b><u>Antikörper</u></b>	<b><u>Markierung</u></b>	<b><u>Herkunft</u></b>	<b><u>Verdünnung</u></b>	<b><u>Herkunft/Referenz</u></b>
anti-Kaninchen	Alexa488	Ziege	1 : 300	Aldrich Pharmaceut.
anti-Kaninchen	Alexa595	Ziege	1 : 400	Aldrich Pharmaceut.
anti-Kaninchen	HRP	Ziege	1 : 5000	Sigma
anti-Kaninchen	FITC	Ziege	1 : 100	Aldrich Pharmaceut.
anti-Maus	Alexa488	Ziege	1:300	Aldrich Pharmaceut.

## 2.4. Oliodesoxyribonucleotide ( Primer)

### Herkunft der Primer

<u>Primer</u>	<u>Herkunft</u>
M13forward; M13 revers	Invitrogen
PCR1; PCR5'-Sal; 5A'; PCR9; PCR1; 5B	Dr. Susanne Talay, GBF
SF1; SF3; sfb1; sfb2; sfb3; sfb4; spc1; spc2 ; SR1	MWG

### Primer zur Amplifizierung des Gens *gfbI* aus dem Isolat G59 zur Herstellung eines rekombinanten GST-Fusions-Protein.

<u>Primer</u>	<u>Nukleotidsequenz (5'→3')</u>	<u>Restriktions enzym</u>	<u>Gen- sequenz</u>
PCR1 →	GTAGCCTATGGATCCGATGAGAAG ATGCTGCCGA	<i>Bam</i> HI	157 - 180
PCR5'-Sal ←	TCAAAATGGTCGACTAACTTCGGACGGG TGGAACACTA	<i>Sal</i> I	1682- 1662

**Tab.2:** schwarz = codierende DNA-Bereiche; **rot** = Schnittstellen für Restriktionsenzyme; **blau** = Original-DNA-Sequenz; → forward Primer; ← reverse Primer

### Primer zur Sequenzierung des Gens *gfbI* aus dem Isolat G59

<u>Primer</u>	<u>Nukleotidsequenz (5'→3')</u>	<u>Gensequenz</u>
SF1 →	CTCCTATTTCAATTCTATCTAAGC	(-)187 – (-) 163
SF3 →	ATCGGTTTTGGTCAAGTAGCC	139 – 160
5A' →	CCTCTAGCGGGTGAGTCT	1078 – 1095
PCR9 →	TTTGTACCAGAAAATCCCCCTAAACCTG	782 – 809
PCR1 →	GTAGCCTATGCTGCCGATGAGAAG	157 – 180
SR1 ←	TCCTGTAGGTTGTATGTCTAC	1912 – 1896
5'-Sal ←	TCAAAATGGTCGACTAACTTCGGACGGG	1682 – 1662
5B ←	AGACTCACCCGCTAGAGG	1095 – 1078

**Tab.3:** → forward Primer; ← reverse Primer

**Primer für die Generierung der GfbI-knock-out-Mutante TF59**

<b><u>Primer</u></b>	<b><u>Nukleotidsequenz (5'→3')</u></b>	<b><u>gfbI - Gen- sequenz (nts)</u></b>
sfb1 →	CTCGAG GAAGCCGGTTTTTTGGCACAC <i>XhoI</i>	49 – 69
sfb2 ←	CTGCAGCACTCATGCCTGTTTGAGTGTC <i>PstI</i>	1288 – 1267
sfb3 →	CCGGGCAATTGCCGGGCCAAACTGCGTGTTGTGTTAC <i>MunI</i>	569 – 550
sfb4 ←	GCCGCGCCTAGGCGCGAGTTGGATGGTAGTCCTATTCC <i>AvrII</i>	841 – 863
<b><u>Primer</u></b>	<b><u>Nukleotidsequenz (5'→3')</u></b>	<b><u>spc-Kassette Gensequenz</u></b>
spc1 →	CCCGGCAATTGCCGGATCGATTTTCGTTCGTGAATAC <i>MunI</i>	1 – 21
spc2 ←	GCGCCTAGGCGCGGCCCAATTAGAATGAATATTCCC <i>AvrII</i>	1121 – 1142
<b><u>Primer</u></b>	<b><u>Nukleotidsequenz (5'→3')</u></b>	<b><u>pJRS233 Gensequenz</u></b>
M13forw	CTGGCCGTCGTTTTAC	XXXXX
M13rev.	GTCATAGCTGTTCTG	XXXXX

**Tab.4:** schwarz = codierende Sequenz; rot = Schnittstelle für Restriktionsenzym; blau = Sequenz für Linker; → forward Primer; ← reverse Primer

**2.5. Puffer und Lösungen**

PBS 10x	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28.6 g
KCl	4.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0 g
NaCl	160.0 g
dH <sub>2</sub> O	2000 ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7.0 vor dem Autoklavieren eingestellt.



**PBST**

1x PBS + Tween 20, entsprechend des gewünschten Anteils in %.

**Puffer und Lösungen für DNA-Präparationen****TES-Puffer**

Tris-HCl	50	mM
EDTA	5	mM
NaCl	10	mM

Der pH-Wert der Lösung wurde auf 8.0 eingestellt.

**TE-Puffer**

Tris-HCl	10	mM
EDTA	1	mM

pH-Wert 7.5; vor dem Autoklavieren eingestellt.

**TAE-Puffer (10x-Stock)**

Tris-Base	400	mM
dH <sub>2</sub> O	600	ml
pH-Wert mit konzentriertem Eisessig auf 8.0 einstellen.		
EDTA (pH 8.0)	0.5	M

**TRIS-HCl**

Tris-Base	20	mM
dH <sub>2</sub> O	1000	ml

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7.5 eingestellt.

**Probenpuffer für DNA-Gele**

Bromphenolblau (w/v)	0.25	%
Xylencyanol (w/v)	0.25	%
Glycerol (v/v)	30	%

In 1x TAE-Puffer

**Puffer für SDS-PAGE und Western Blot****Proteinprobenpuffer (1x)**

Tris-HCl	60	mM
SDS	2	%
Glycerol	10	%
Bromphenolblau	0.001	%
β-Mercaptoethanol	5	%
pH-Wert 6.8		

**Sammelgelpuffer**

Tris-HCl (pH 6.5)	0.5	mM
-------------------	-----	----

**Trenngelpuffer**

Tris-HCl (pH 8.5)	0.5	mM
-------------------	-----	----

**10% Trenngel**

dH <sub>2</sub> O	3	ml
10% SDS	75	μl
Trenngelpuffer	1.9	ml
Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0.8%)	2.5	ml
10% Ammoniumpersulfat (APS)	40	μl
TEMED	4	μl

**4% Sammelgel**

dH <sub>2</sub> O	2.5	ml
10% SDS	40	μl
Trenngelpuffer	1.0	ml
Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0.8%)	0.5	ml
10% APS	20	μl
TEMED	4	μl

**Laufpuffer SDS (10x-Stock)**

Tris-HCl	30	g
SDS	10	g
Glycerol	144	g
pH-Wert 8.3		

**Coomassie-Färbelösung**

Coomassieblau	0.1	%
Methanol	40	%
Eisessig	10	%

**Coomassie-Entfärbelösung**

Methanol	40	%
Eisessig	10	%

**Semi Dry Blottingpuffer (pH 9.2)**

Tris-Base	25	mM
SDS (10%-ig)	3.75	ml
Glycin	2.93	g
Methanol (p.A.)	20	%

**Puffer für die Säulenchromatographische Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen****Elutionspuffer**

Glutathion	10	mM
in Tris (pH 8.0)	50	mM
(frisch angesetzt)		

**Regenerationspuffer R1**

Tris (pH 8.5)	0.1	M
NaCl	0.5	M

**Regenerationspuffer R2**

NaAcetat (pH 4.5)	0.1	M
NaCl	0.5	M

**Puffer zur Abspaltung von GST-Fusions-Proteinen****Prescission-Protease-Cleavage-Puffer (2 l)**

Tris-HCl	50	mM
NaCl	150	mM
EDTA (pH 8.0)	1	mM
DTT	1	mM

**Puffer zur Kopplung von rekombinantem Gfbl an CNBr-Sephrose****Coupling Puffer:**

NaHCO <sub>3</sub>	0.1	M
NaCl	0.5	M
pH 8.3		

**R1- Regenerations-Puffer:**

Tris-HCl	0.1	M
NaCl	0.5	M
pH 8.0		

**R2- Regenerations -Puffer:**

Na-Acetat	0.1	M
NaCl	0.5	M
pH 4.0		

**Blocking-Puffer:**

Tris-HCl	0.1	M
pH 8.0		

**Puffer für radioaktive Bindungsversuche****PB Puffer pH 7.5 (nach Manniatis)**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80	mM

TCA	10	%
in dH <sub>2</sub> O		

**Puffer, Lösungen und Harze für die Elektronenmikroskopie****Cacodylatpuffer**

Cacodylat	0.1	M
Sucrose	0.09	M
MgCl <sub>2</sub>	0.01	M
CaCl <sub>2</sub>	0.01	M
pH-Wert 6.9		

**Fixierlösung für TEM und REM**

Glutaraldehyd	3	%
Formaldehyd	5	%
in Cacodylatpuffer (pH 6.9)		

**Fixierlösung für TEM und anschließender Antikörper-Inkubation (PEL)**

Glutaraldehyd (25%-ig)	0.2	%
Formaldehyd (36.5%-ig)	0.5	%
in Cacodylatpuffer (pH 6.9)		

**Bleicitratlösung zum Nachkontrastieren**

Bleicitrat	0.2	g
Bleinitrat	0.15	g
Bleiacetat x 3 H <sub>2</sub> O	0.15	g
NaCitrat x 2 H <sub>2</sub> O	0.15	g
ad dH <sub>2</sub> O (CO <sub>2</sub> -frei )	41	ml
NaOH (10N) zum Lösen		

**Herstellung von Spurr-Harz**

<u>Chemikalien</u>		<u>1x</u>
ERL		10.0 ml
NSA		26.0 ml
DMAE		0.4 ml
DER736	<u>für Standard</u>	6.0 ml
DER736	<u>für harte Harze</u>	4.0 ml
DER736	<u>für weiche Harze</u>	8.0 ml

## 2.6. Materialien, Chemikalien, Kits, Plasmide

### 2.6.1. Chemikalienliste

Chemikalien	Hersteller
ABTS <sup>®</sup> -Tabletten	Boehringer
ABTS <sup>®</sup> -Puffer	Boehringer
Agarose	NEEO Ultra QualitätRoth
Alexa Fluor 488/595	MoBiTec
Ammoniumacetat	Riedel-de-Han, AG
Acrylamid / Bisacrylamid	Metra
Ammoniumpersulfat	BioRad
Ampicillin	Sigma
Bacto Trypton	Difco
Bacto Yeast	Difco
Bleicitrat	Merck
Blocking-Reagenz	Roche
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
Chloramin-T	Serva
CnBr	Cyanbromid
Coomassie R-250 Brilliant Blue	Sigma
DER736	Ted. Pella, INC
DMAE(S1)	Plano
DMEM	Gibco
dNTP Mix	MBI Fermentas
ERL	Ted Pella, INC
EDTA	Serva
Eisessig	J.T. Baker
Entwicklerlösung für Röntgenfilme	Kodak
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Roth
Fibronektinfragmente	Sigma
Humanes Fibronektin	ICN
Ficoll	Pharmacia
Freud's Adjuvant (Incomplete)	Sigma
Gentamycin	Sigma
Fixiererlösung für Röntgenfilme	Kodak
N-Propyl-Gallat	Sigma
L-Glutamin 100x (200mM)	Gibco
GeneRuler <sup>™</sup> DNA Ladder Mix	MBI Fermentas
HEPES	Gibco

**2.6.1. Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Isopropanol	J.T. Baker
IPTG	Sigma
Kaliumchlorid	Riedel-de-Han, AG
Iod <sup>125</sup>	Amersham
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de-Han, AG
Kanamycin	Sigma
Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm	Kodak
N-Laurylsarcosyl Natriumsalz	Fluka
Magermilch	Glücksklee
β-Mercaptoethanol	Serva
Methanol	J.T. Baker
Moviol 4-88	Calbiochem
Mutanolysin	Sigma
NaOH	Riedel-de-Han, AG
Natriumpyruvat	Gibco
NSA	Agar scientific
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin (5000 U/ml)/Streptomycin (5000 µg/ml)	Sigma
Penicillin G Sodium (1610 U/mg)	Sigma
Phenol/TE	Roth
Poly-L-Lysin	Sigma
PMSF	Sigma
Protein A/G markierte Goldpartikel 10 nm ø	BioCell
RPMI 1640	Gibco
Salzsäure	J.T. Baker
SDS 7b Proteinstandard	Sigma
Sodiumdodecylsulfat	Serva
Streptomycin	Serva
Tris-Acetat	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trichloressigsäure	Fluka
TEMED	BioRad
THB	Roth
TSB	Roth

### 2.6.1. Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Trypsin-EDTA	Gibco
Trypsin-Inhibitor	Sigma
Tween 20	Fluka
Uranylacetat	Agar Scientific
Xylencyanol	Serva

Alle anderen, nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

### 2.6.2. Vektoren

Vektor	Selektion	Referenz
pGEX-6P-1	Ap <sup>r</sup>	Pharmacia
pCR2.1	Amp,Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pJRS233	Ery <sup>r</sup>	Perez-Casal <i>et al.</i> (1993)

## 2.7. Molekularbiologische Arbeiten

### 2.7.1. Isolierung chromosomaler DNA aus Streptokokken der Gruppe A und G

14 ml Todd-Hewitt-Medium (THY) für GAS, bzw. THB für GGS wurden mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6-0.8 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 5000 rpm 10 Min. zentrifugiert (Biofuge 15R, Heraeus) und das Pellet in 3.5 ml Puffer B1 (Qiagen; Genomic DNA Buffer Set) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte enzymatisch durch Zugabe von 50 µl Mutanolysin (5000U/ml, Sigma), einer für die Zellwand von Streptokokken spezifischen Amidase, sowie 50 µl Lysozym (25 mg/ml, Sigma) und 50 µl RNase (5 mg/ml, Sigma) für 30 Min. bei 37°C in einem Wasserbad. Wurde die Lösung nach dieser Zeit nicht deutlich viskoser, wurde sie für weitere 30 Min. im Wasserbad belassen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Pronase E und einer weiteren Inkubation für 30-45 Min., bis die Lösung klar wurde. Die anschließende Isolierung der DNA erfolgte mit dem Genomic DNA Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben. Für eine effizientere Elution der chromosomalen DNA wurde der Elutionspuffer (QF; Qiagen) auf 50 °C vorgewärmt, bevor er auf die Säule gegeben wurde.



### 2.7.2. Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA

#### Isolierung

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung der Plasmid-Reinigungs Kits (Qiaprep-Spin-Plasmid-Kit; Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Integrität der Plasmide wurde durch Agarosegelelektrophorese (s. 2.7.4.) überprüft.

#### Fällung

Die DNA wurde aus einer Lösung durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 6.0 und 2.5 Volumen eiskaltem Ethanol gefällt. Der Ansatz wurde invertiert und zum vollständigen Durcheinander für 30 Sek. in flüssigen Stickstoff getaucht, anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut und für 10 Min. bei max. Drehzahl zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und in Tris-HCl (pH 8.5) resuspendiert.

#### Gelextraktion

Bei dieser Methode wurde der Gelextraktions-Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurde zunächst der gesamte Reaktionsansatz mit dem gleichem Volumen 1x Probenpuffer versetzt und auf ein 0.8%-iges Agarosegel geladen. Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Die weitere Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

### 2.7.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (nach Saiki *et al.*, 1985) wurde verwendet, um spezifische DNA-Fragmente für Sequenzierung und Klonierungen anzureichern, bzw. im Rahmen von Kolonie-PCRs das Vorhandensein spezifischer Sequenzen in einzelnen Klonen zu überprüfen. Für Kolonie-PCR mit Gruppe C und G Streptokokken wurde zur Gewinnung von Template DNA der Insta-Gene-Kit (Biorad) entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet.

#### Typischer PCR- Ansatz

- 10x PCR-Puffer (polymerasespezifisch)	5 µl
- MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µl
- dNTP-Mix (je 2.5 mM)	5 µl
- je Oligonukleotid (10 pmol/µl)	je 1 µl
- Template DNA (~ 100 ng Plasmid/chromosomale DNA)	1 µl
- dH <sub>2</sub> O	ad 49.2 µl
- Taq-Polymerase (5 U/µl)	0.8 µl

### Typisches PCR-Program

Vor-Denaturierung	95°	7 Min.	
(1)	94°	15 Sek.	] — 35 x
(2)	X°	20 Sek.	
(3)	72°	Y Sek.	
Endpolymerisation	72°	5 Min.	

**X** = optimale Temperatur für Primerhybridisierung

**Y** = Abhängig von der Prozessivität der Polymerase; für *Taq*-Polymerase von Qiagen 2000 bp / Min. . Das Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase liegt bei 72°C.

- (1) Hitzedenaturierung zerlegt die DNA-Helix in zwei Einzelstränge
- (2) Hybridisierung der Primer
- (3) Elongation (Polymerisation des komplementären Stranges zur Template-DNA)

Für die Durchführung einer Kolonie-PCR zum schnellen Screening nach positiven Klonen wurde ein Teil einer Kolonie mit einem Zahnstocher in ein PCR-Reaktionsgefäß (50 µl) überführt. Nach Zugabe des Mastermixes wurde die Probe durch Vortexen homogenisiert. Zuletzt wurde die *Taq*-Polymerase zugegeben. Die Temperatur der Vordenaturierung war ausreichend, um die Zellwand der *E. coli* Bakterien zu zerstören.

#### 2.7.4. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Molekülen im elektrischen Feld verwendet.

In Gelen aus 0.8%- bis 2%iger Agarose in TAE-Puffer konnten Fragmente im Größenbereich zwischen 400 bp bis 10 kb bei einer Spannung von 120V aufgetrennt werden. Die Proben wurden mit 6x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen geladen, nachdem diese in der Kammer mit TAE-Puffer gefüllt waren. Als Größenmarker diente *Hind*III verdaute λ-Phagen-DNA (New England Biolabs), sowie der DNA-ladder-Mix (Fermentas). Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid (1%) angefärbt und die DNA-Fragmente unter UV-Licht (HEROLAB UVT) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert (HEROLAB EASY- System K429).

#### 2.7.5. Herstellung einer Sonde für die Southern-Blot-Analyse

Für die Identifikation eines Gens, welches für ein Fibronectin bindendes Protein codiert, wurde ein Fragment des Gens *sfbl* aus *S. pyogenes* Stamm A20 mit Hilfe der PCR (s.2.7.3.) amplifiziert. Dazu wurden die Primer PCR9 / PCR5' Sal (s.2.4.) und DIG-gekoppelte dNTPs (Roche Diagnostics) verwendet. Das erhaltene Produkt wurde über seine Größe per Agarosegelelektrophorese verifiziert und mit einem PCR-Purification-Kit von Qiagen aufgereinigt.

### 2.7.6. Southern-Blot und Entwicklung der Blotmembran

2 µg chromosomaler DNA der Stämme A20, G48 und G59 wurden ü.N. mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einem 1%-igem Agarosegel aufgetrennt. Als Marker wurde der  $\lambda$ -*HindIII*-DIG-Marker verwendet. Dieser wurde ebenso wie Blocking-Reagenz, Heringssperm-DNA, anti-DIG-Antikörper und das Substrat CSPD von der Firma Roche Diagnostics bezogen. Anschließender Southern Blot mit Hilfe eines Vakuum Blotters (Appligene-Oncor; Aufbau gemäß Herstellerangaben) führte bei 50 mbar Unterdruck zum Transfer der Nukleotid-Fragmente vom Gel auf eine darunter befindliche Nylonmembran (Biodyne B Transfer Membran, Pall). Dazu wurde das Gel zu Beginn des Transfers 15 Min. mit Puffer 1 (s. 2.5.) überschichtet, anschließend die DNA-Fragmente für 20 Min. mit Puffer 2 denaturiert, ebenso lange durch Puffer 3 neutralisiert und abschließend mit 1x SSC äquilibriert.

#### Entwicklung der Blotmembran

Auf der getrockneten Nylonmembran wurden die DNA-Fragmente durch 30 Sekunden UV-crosslink (UV-Stratalinker1800; Stratagene) und backen bei 120°C für 20 Min. fixiert. Prähybridisierung erfolgte mit einer High-SDS-Hybridisierungslösung (20 ml/100cm<sup>2</sup> Membran) für 2h bei 42°C im Hybridisierungssofen (Hybridisierungssofen 1012; Shellab)). 100 ng DIG-Sonde (s. 2.7.5.) wurden mit 100 µl Heringssperm-DNA 10 Min. aufgekocht, zu der bereits bei 42°C verwendeten Vorhybridisierungslösung zugegeben und ü.N. bei 42°C inkubiert.

Der Blot wurde anschließend gründlich wie folgt gewaschen: 2 x 10 Min. bei RT mit Waschpuffer 1, 2 x 15 Min. bei 64°C mit Waschpuffer 2 und 1 x 5 Min. bei RT mit Waschpuffer 3. Anschließend wurde die Membran für 30 Min. mit Blockingpuffer abgesättigt. Der Puffer wurde durch neuen Puffer ausgetauscht, dem anti-DIG-AK in einer Verdünnung von 1:10000 zugesetzt wurden. Die Antikörper waren mit alkalischer Phosphatase gekoppelt und die Inkubation erfolgte für weitere 30 Min. bei RT. Die nicht gebundenen Antikörper wurden durch Waschen für 2 x 15 Min. bei RT mit Waschpuffer 3 entfernt. Durch die Inkubation mit Detektionspuffer für 2 x 5 Min. bei RT wurde die Membran auf einen alkalischen pH-Wert gebracht. Der Detektionspuffer wurde in einem neuen Ansatz mit der CSPD-Substratlösung in einer 1:100 Verdünnung versetzt und für 5 Min. bei RT mit der Membran inkubiert.

Der Blot wurde anschließend in Frischhaltefolie gewickelt, um ein Austrocknen zu vermeiden, und 15 Min. bei 37°C inkubiert. Die Belichtung des Films (Kodak X-Omat) erfolgte durch Auflegen auf den Blot für 30-50 Min. und anschließende Filmentwicklung mit den Entwickler-Lösungen (G153 Entwicklungs-Lösung A+B; G354 Fixierlösung) der Firma Agfa.

**Lösungen und Puffer für den Southern Blot****Puffer 1 (Depurinierung):**

HCl	0.25	M
-----	------	---

**Puffer 2 (Denaturierung) :**

NaOH	0.5	M
------	-----	---

NaCl	1.5	M
------	-----	---

**Puffer 3 (Neutralisierung):**

Tris-HCl pH 7.0	1.5	M
-----------------	-----	---

**SSC-Puffer (20x-Stock)**

NaCl	3	M
------	---	---

NaCitrat x 2 H <sub>2</sub> O	0.3	M
-------------------------------	-----	---

pH 7.0; Lösung wurde autoklaviert.

**Hybridisierungs-Puffer (für 150 ml)**

SDS	0.5	g
-----	-----	---

Formamid	75	ml
----------	----	----

SSC (20x )	37.5	ml
------------	------	----

Na-Phosphat-Puffer (1M; pH 7.0)	7.5	ml
---------------------------------	-----	----

N-Lauryl-Sarcosyl (10%-ig)	1.5	ml
----------------------------	-----	----

Blocking-Reagenz (10%-ig)	30.0	ml
---------------------------	------	----

(Puffer nach Manniatis)

**Maleinsäure-Puffer (10x-Stock)**

Maleinsäure	1	M
-------------	---	---

NaCl	1.5	M
------	-----	---

dH <sub>2</sub> O	500	ml
-------------------	-----	----

Mit NaOH wurde der pH-Wert auf 7.5 eingestellt.

**Waschpuffer 1:**

2 x SSC + 0.1% SDS

**Waschpuffer 2:**

0.1 x SSC + 0.1% SDS

**Waschpuffer 3:**

Maleinsäurepuffer	0.1	M
-------------------	-----	---

Tween 20	0.3	%
----------	-----	---

**Blocking-Puffer**

Maleinsäurepuffer	1	M
-------------------	---	---

Blockierungsreagenz (Roche)	10	%
-----------------------------	----	---

**Detektionspuffer**

Tris-HCl	100	mM
NaCl	100	mM
MgCl <sub>2</sub>	50	mM

Der pH-Wert wurde auf 9.5 eingestellt.

**2.7.7. Ligation**

Ligationen von DNA-Fragmenten in entsprechend verdaute Klonierungsvektoren wurden mit T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) in dem vom Hersteller mitgelieferten T4-Ligase-Puffer bei 16°C ü.N. durchgeführt. Die DNA-Fragmente, die über die PCR mittels *Taq*-DNA-Polymerase generiert wurden, konnten ohne weiteren Verdau direkt mit dem TOPO-TA-Kit von Invitrogen ü.N. in den Vector pCR2.1 ligiert werden. Dieser hat an seinen offenen Enden einen polyTTTT-Tail, der mit den polyAAA-Enden des PCR-Produktes komplementär hybridisiert. Wichtig war ein Verhältnis von 1:5 von Vektor zu ligierendem Fragment.

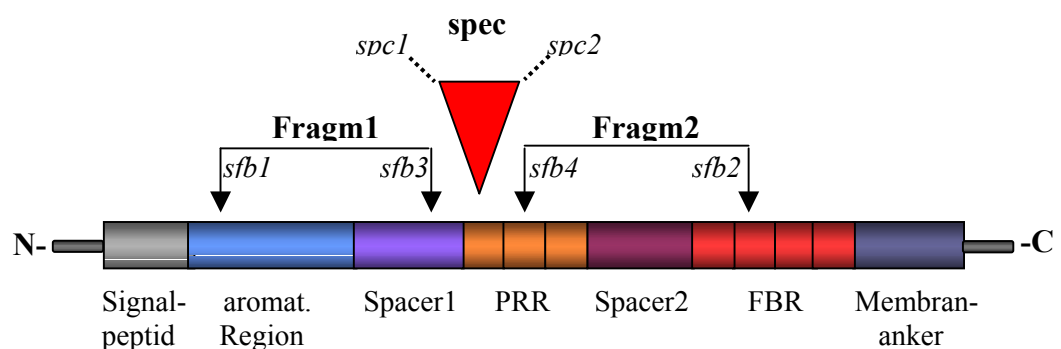
**2.7.8. Klonierungen****2.7.8.1. Klonierung von *GfbI* in den GST-Fusionsvektor pGEx-6P-1**

Das Gen für das Fibronektin bindende Protein wurde mit den Primern PCR1/PCR5' Sal über PCR aus der chromosomalen DNA des Stammes G59 amplifiziert, ü.N. in den Vector pCR2.1 (TOPO-TA-cloning Kit; Invitrogen) subkloniert und in kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen (Invitrogen; s. auch 2.7.10.1) transformiert. Ausplattieren der positiven, weißen Kolonien auf Selektiv-Agarplatten ermöglichte die Selektion positiver Klone und die Überprüfung des Inserts per PCR. Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau des PCR-Produktes sowie des Vektors pGEX-6P-1 mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I. Beide Lösungen wurden vermischt und durch NaAc / Ethanol-Fällung (s.2.7.2.) gereinigt (Fällung in die Ligation). Die Ligation erfolgte wie unter 2.7.7. beschrieben. Mit dem Ligationsansatz wurden TSS-kompetente *E. coli* HB101-Zellen transformiert (s.2.7.10.1.) und auf LB-Agarplatten unter Verwendung von Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) selektioniert. Die Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (s.2.7.3.) mit den Primern PCR1/PCR5' Sal auf das Insert überprüft und positive Klone ü.N. in LB-Medium und Antibiotikum selektiv angezogen.

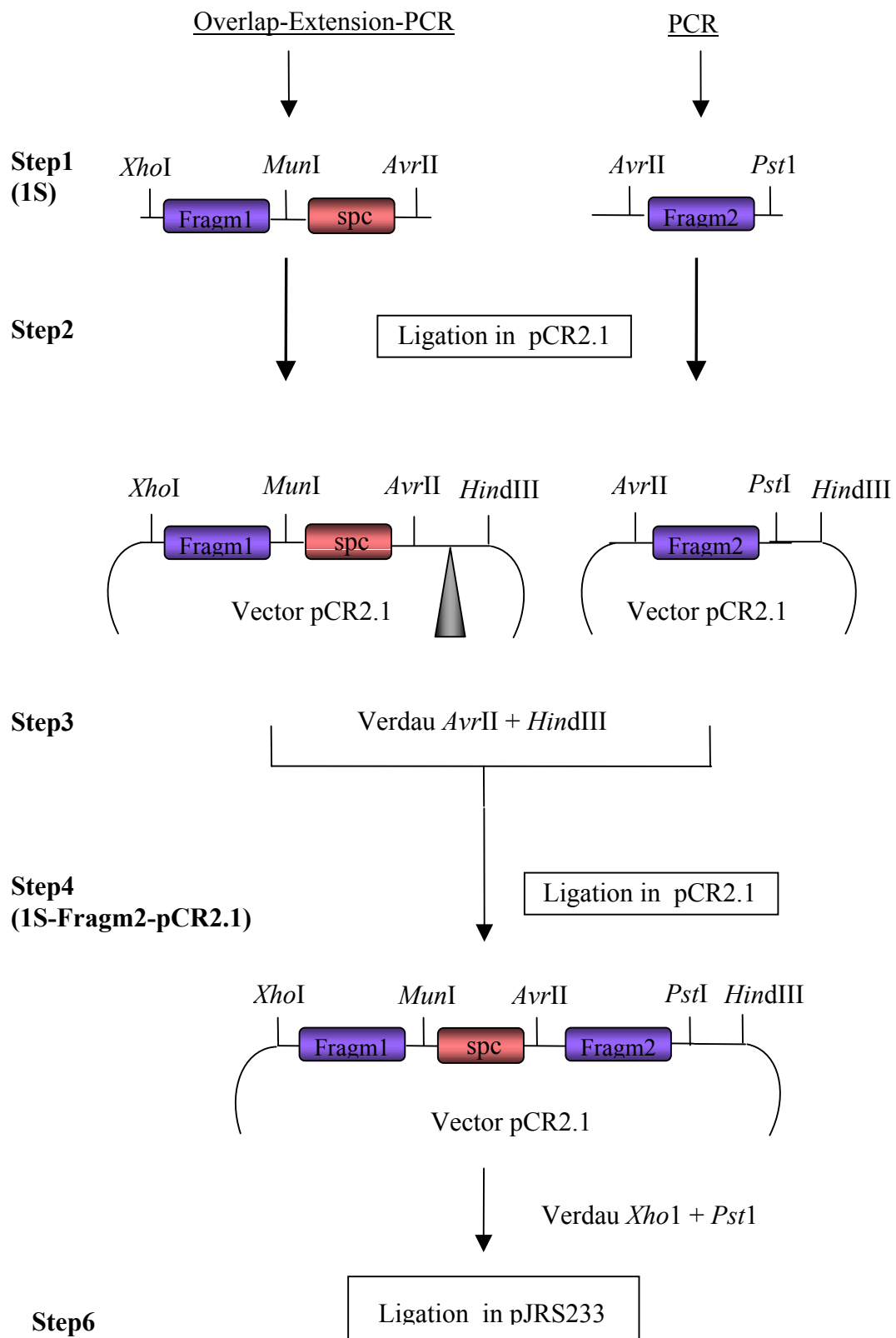
**2.7.8.2. Klonierungen für die knock-out-Mutante (TF59)**

Für die Konstruktion des Insertionskonstruktes zur Generierung einer knock-out-Mutante wurde als Template-DNA die Gensequenz des Gens *gfbI* verwendet. Dieses wurde mit dem Primerpaar SF1/SR1 aus der chromosomalen DNA des Isolates G59

gewonnen und anschließend in den pCR2.1-Vektor ligiert (s.2.7.11.). Nach Anreicherung und Isolierung der Plasmide wurden zunächst verschiedene PCR-Produkte generiert (s.Abb.1). Das Primerpaar *sfb1/sfb3* ergab Fragment 1 (Fragm1) aus dem variablen Bereich des Genes. Die Primer *sfb2/sfb4* amplifizierten Fragment 2 (Fragm2) aus dem konservierten Bereich des Gens, und *spc1/spc2* lieferten die komplette Sequenz der Spectinomycinresistenz-Kassette (*spc*) (*aad9*, Acc.NC\_03737). Diese Kassette enthält sowohl einen Promotor, welcher die Expression der Resistenz ermöglicht, als auch einen folgenden Translationsstop. Eine Overlap-Extension-PCR mit den Primern *sfb1/spc2* resultierten in einer Verbindung des Fragment 1 (Fragm1) mit der Antibiotikum-Kassette (1S) (s.Abb.2/Step1). Die Fragmente 1S und Fragm 2 wurden in den Vektor pCR2.1 (TOPO; Invitrogen) ligiert (Step2), in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und anschließend isoliert. Restriktionsverdau mit den Enzymen *AvrII* und *HindIII* führte zur Öffnung des 1S-pCR2.1-Vektors, während das Fragm 2 aus Fragm2-pCR2.1-Vektor vollständig herausgeschnitten wurde (s.Abb2./Step3). Letzteres wurde durch Gelextraktion (DNA-Gelextraktion-Kit; Qiagen) gewonnen, ü.N. in den geöffneten 1S-pCR2.1-Vektor ligiert und in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert (2.7.10.). Anschließende Kolonie-PCR mit den Primern *sfb1/sfb2* bestätigte die Verbindung der Fragmente zu dem Konstrukt 1S-Fragm2-pCR2.1 (Step4). Dieses Plasmid wurden mittels Plasmid-Isolierung (s.2.7.2.) aufgereinigt. Für die Transformation wurde der Vektor pJRS233 verwendet, welcher die Transformation von GAS ermöglichte (Perez-Casal *et al.*, 1993) und somit auch für die Transformation von GGS geeignet schien. Der Vektor pJRS233 und das Konstrukt 1S-Fragm2-pCR2.1 wurden mit den Enzymen *XhoI/PstI* verdaut (Abb.2/Step5). Nach der Reinigung des geöffneten Vektors pJRS233 durch Ethanol-Fällung wurde dieser mit dem über Gelextraktion gereinigten, verdauten 1S2-Fragment ü.N. ligiert (2.7.7.) (Abb.2/Step6) und in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Nach der Anzucht der Zellen in LB-Medium erfolgte die Überprüfung der Klone mittels PCR (s.2.7.3.).



**Abb.1:** Lage der für das Insertionskonstrukt amplifizierten PCR-Fragmente, ausgehend von der Sequenz des Genes *gfbI* aus dem Isolat G59 (s. 2.7.11.) und den daraus erhaltenen Proteindomänen. **PRR** = prolinreiche Region; **FBR** = Fibronectin bindende Region; *sfb1/sfb3*, *spc1/spc2*, *sfb4/sfb2* = verwendete Primerpaare.

**Abb.2: Ablauf der Klonierung des Insertionskonstruktes****Abb.2: Ablauf der Klonierung des Insertionskonstruktes**

### 2.7.9. Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* (nach Cheng *et al.*, 1989)

100 ml vorgewärmtes LB-Medium wurden mit 1 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD von 0.2-0.3 unter Schütteln inkubiert. Nach 10 Min. auf Eis wurde der Ansatz 10 Min. bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge 15 R, Heraeus) und das Pellet anschließend in 1/10 Volumen des ursprünglichen Ansatzes eiskaltem TSS-Medium resuspendiert und aliquotiert. Die Proben wurden für 1 Min. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 2.7.10. Transformation

#### 2.7.10.1. Transformation zur Anreicherung und Gewinnung von Plasmiden aus *E.coli*

200 µl kompetente Zellen (2.7.9.) wurden mit der zu transformierenden DNA (10 µl Ligationsansatz) vorsichtig vermischt und 1h auf Eis inkubiert. Nach 60 Sek. Hitzeschock bei 42°C erfolgte Zugabe von 1 ml vorgewärmtem Medium und erneute Inkubation für 1h bei 37°C unter leichtem Invertieren. Aliquots wurden auf Selektiv-Agarplatten ausplattiert und die Kolonien ü.N. bei 37°C hochgezogen.

#### 2.7.10.2. Transformation von GGS mittels Elektroporation

(basierend auf Protokoll von I. Sastalla; GBF; Braunschweig)

50 ml TSB-Medium wurden mit 3 ml einer ü.N.-Kultur von Streptokokken beimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0.2 hochgezogen. Nach Zentrifugation für 10 Min. bei 5000 rpm und RT wurde das Pellet 2x mit 4°C kaltem EPB3-Puffer gewaschen und in 600 µl EPB3-Puffer resuspendiert. Je ein 200 µl Aliquot wurden mit 10 µl Vektor-DNA (pJRS233\_ghfI::spc) versetzt und in eine Elektroporationsküvette (Biorad) überführt. Die Elektroporation erfolgte mit der Elektroporations-Apparatur von BioRad unter 400 Ohm, 25 µF; und 1.75 kV. Danach wurde sofort 1 ml eiskaltes THB-Medium mit 25 M Sucrose in einer Küvette mit den Zellen vermischt und die Suspension in 9 ml 30°C warmes THB-Medium mit 25 M Sucrose überführt. Dieser Schritt dient der autonomen Replikation des Plasmides. Nach 2h Inkubation bei 30°C erfolgte Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 Min. in der Biorad 15R Zentrifuge (Heraeus), Resuspendierung in 1 ml Medium und Überführung in 9 ml frisches, 30°C warmes Medium. Diese Inkubation wurde einmal wiederholt, bevor das resuspendierte Pellet in 49 ml vorgewärmtes Medium gegeben wurde. Zusätzlich wurden im letzten Schritt dem Medium 0.5 µg/ml Erythromycin als Antibiotikum zugesetzt, da der Vektor pJRS233 eine entsprechende Resistenz aufweist. Inkubiert wurde ü.N. bei 30°C. Am nächsten Morgen wurde die



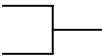
Kultur bei 5000 rpm (Biofuge 15R; Heraeus) für 10 Min. zentrifugiert und das Pellet in 1 ml THB-Medium aufgenommen. 500 µl wurden als Aliquot in eine Petrischale gegeben und mit frisch hergestelltem Blutagar (Schafsblut 5 %; Erythromycin 0.5 µg/ml) überschichtet und homogen vermischt. Anschließend Inkubation bei 30°C erfolgte ü.N.. Vorhandene Kolonien wurden am nächsten Tag mit einer Pasteur-Pipette gepickt, gepoolt und in 15 ml THB Medium ü.N. bei 30°C inkubiert und bei 5000 rpm (Biofuge 15R; Heraeus) für 10 Min. pelletiert, in 500 µl THB-Medium resuspendiert und auf Selektiv-Blutagarplatten ü.N. bei 30 °C angezogen. Vorhandene Kolonien wurden mit einem Slidex-Kit (StreptoKit A,B,C,D,E,F,G; BioMerieux) auf Gruppe G Streptokokken getestet und mit einer Kolonie-PCR nach einem InstaGene-Aufschluß (InstaGene™ Matrix; Biorad) auf Vorhandensein des Plasmids überprüft. Für die homologe Rekombination ins Chromosom wurde ein Temperaturshift auf 37°C durchgeführt. Tägliches Überimpfen auf frische Agarplatten wurde bis zu einer positiven PCR-Reaktion durchgeführt. Danach wurden die positiven Klone zur Erhöhung des Selektionsdruckes zunächst zusätzlich, im weiteren Verlauf ausschließlich unter Verwendung von 80 µg/ml Spectinomycin kultiviert. Für die Verifizierung der Rekombination und zum Feststellen der Orientierung des Konstruktes im Chromosom wurden die Primer SF1; SR1; M13forw; M13rev.; PCR1; 5A'; PCR5'-Sal; sfb1 und sfb2 verwendet (s.2.4.).

### 2.7.11. Sequenzierung von DNA

#### Sequenzierung des Fibronectin bindenden Genes aus dem Stamm G59

Das Gen für das Fibronectin bindende Protein (GfbI) wurde auf der gesamten Länge mit dem Primerpaar SF1/SR1 aus der chromosomalen DNA des Stammes G59 amplifiziert, verwendet wurde hierbei eine VENT-Polymerase mit Proof-reading Funktion (Invitrogen). Diese Funktion stellt die möglichst fehlerfreie Amplifizierung der gewünschten DNA sicher. Das PCR-Produkt wurde anschließend in den TOPO Vektor pCR2.1 ligiert und in kompetente DH5α-Zellen transformiert. Kolonie-PCR und Agarosegelelektrophorese lieferte den Beweis positiver Klone mit dem Gesamt-Gen als Insert. Nach Anreicherung und Isolierung der Plasmide wurden die unter 2.4.2. aufgeführten Primer in der Sequenz-Reaktion eingesetzt (Sequencing Big-Dye Version 3.0 Kit; Applied Biosystems).

#### Sequenzierungs-Reaktion:

15 Sek.	96° C		25 x
Annealing Temp.	4.15 Min.		
hold	10° C		

### **Sequenzierung der Insertions-Mutante TF59 zur Überprüfung der Insertion**

Zu diesem Zweck wurde chromosomale DNA des Wildtyps und der Mutante TF59 wie unter 2.7.1. beschrieben gewonnen. Die DNA (0.35 µg/µl) wurde 1:100 verdünnt und mit dem Primerpaar PCR1/5B ein PCR-Produkt generiert (2.7.3.), welches über ein 1%-iges Agarosegel mit Hilfe des Gelextraktion-Kit (Qiagen) aufgereinigt wurde. 1 µl und 3 µl der so erhaltenen DNA wurde in jeweils einem doppelten Ansatz mit den Primern PCR1 und 5B (s.2.4.) sequenziert. Verwendet wurde der Sequencing Big-Dye Version 3.0 Kit von Applied Biosystems. Die Reinigung erfolgte ebenfalls mit dem Dye-exe-Purification-Kit von Qiagen mit anschließender Trocknung der DNA in der Speed-vac (DNA Speed-vac DNA 120; Savant). Die Sequenzierung wurde vom Sequenzier-Team der GBF durchgeführt.

### **Sequenzierung der Nucleotidsequenz für das rekombinante, Fibronectin bindende Protein aus dem Stamm G59**

Zur Überprüfung der Gensequenz für das rekombinante Protein wurde mit dem Primerpaar PCR1/PCR5'Sal das klonierte Fragment aus dem isolierten Vektor pCR2.1 (s.2.7.9.1.) amplifiziert. Nach Reinigung mit dem Qiaquick-PCR-Purifikation-Kit (Qiagen) wurde die Sequenzreaktion (2.7.13.1) mit den Oligos SF1; SR1; PCR9; 5'-Sal; 5A; 5B und SF3 (2.4.2.) durchgeführt.

### **2.7.12. Elektronische Datenverarbeitung**

Für die Analysen der DNA-Sequenzen und für Alignements mit den DNA-Sequenzen des *sfbI*-Genes aus *S. pyogenes* (Talay *et al.*; NCBI, Genbank AccNo.X67947) und des *gfbA*-Genes aus Gruppe G Streptokokken (Kline *et al.*; NCBI, Genbank AccNo. U31115) wurden die Programme Editseq, Seqman und Megaligne des Citrix DNASTAR LaserGene verwendet. Die Alignements erfolgten alle nach der Clustal W Methode. In der Internetdatenbank fanden die Programme BLAST und FASTA des National Center for Biotechnology Information (NCBI) für Sequenzvergleiche Verwendung.

Die Übersetzung der DNA-Sequenzen in die Aminosäuresequenz sowie deren Analysen erfolgte mit dem Internetprogramm BCM Searchlauncher.

## 2.8. Proteinbiochemische Methoden

### 2.8.1. Herstellung und Aufreinigung von rekombinantem GfbI-Fusionsprotein

Nach der Klonierung des *gfbI*-Genes in den Überexpressionsvektor pGEX-6P-1 wurden die in der PCR positiv getesteten Transformanten in einer small-scale-Expression auf ihre Expressionsfähigkeit überprüft. Dazu wurden aus einer positiven *E. coli* ü.N.-Kultur 1 ml in 2 ml LB-Medium, welches 100 µg Ampicillin und 2 mM IPTG enthielt, überimpft. Expression der Fusionsprotein erfolgte für 4h bei 30°C unter Schütteln. Nach Zentrifugation bei maximaler U/Min. wurde das Pellet in 200 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert, 20 µl davon aufgekocht und in der SDS-PAGE (s.2.8.2.1.) analysiert. Ein *E.coli*-Stamm mit Vektor pGEX-6P-1, aber ohne Insert, wurde als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

In einer large-scale-Überexpression wurden 5 x 125 ml LB-Medium inclusive Antibiotikum mit 1 ml einer ü.N.-Kultur beimpft. Nach Inkubation unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0.8 bei 37°C erfolgte die Zugabe von je 125 ml LB-Medium mit 2mM IPTG und Expression der Fusionsproteine ü.N. bei 30°C. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen bei 8000 rpm für 10 Min. pelletiert und in 20 ml PBS resuspendiert. Nach Zugabe von PMSF (1mM) erfolgte der Zellaufschluß in einer French-Press (SLM-Aminco; 40.000PSI) im 20 ml Stahlzylinder bei 1000 bar – wobei die Druckentlastung zum mechanisch Aufplatzen der Zellen führte. Anschließende Zentrifugation bei 15000 rpm (SS34-Rotor, RC5C-Zentrifuge; Sorvall) für 15 Min. ergab ein Lysat (ca. 10 ml), welches das rekombinate GST-Fusionsprotein enthält. Dieses wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C weggefroren, nachdem ein Aliquot (25 µl) in der SDS-PAGE auf Expression überprüft wurde.

### Säulen-Chromatographische Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine aus den so gewonnenen Bakterienlysaten binden spezifisch an das Säulenmaterial Glutathion-Sepharose (Glutathion-Sepharose 4B; Amersham Bioscience). Für die folgenden Arbeitsschritte wurde die Chromatographieanlage von Pharmacia F.C. verwendet. Über ein 5 ml Gelbett-Volumen, welches mit PBS äquilibriert wurde, wurde das gewonnene Lysat (10 ml) gegeben. Die Waschschrte erfolgten mit PBS. Der Elutionspuffer (s.2.5.) ermöglichte die Elution des GST-Fusionsproteins, welches anschließend gegen PBS bei 4°C ü.N. in einer Slide A-Lyzer Dialysekassette (3-12 ml, 10kDa Ausschlußgröße, Pierce) dialysiert und bei -20°C aufbewahrt wurden. Die Regeneration der Säule erfolgte durch die Puffer R1 und R2.

## 2.8.2. Funktionaler Aktivitätsnachweis im Overlay-Blot

### 2.8.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli *et al.*, 1970)

In diesem Verfahren werden Proteine denaturiert und durch SDS neutralisiert, so dass sie nur aufgrund ihres Molekulargewichtes elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei wurden sie in einem 4%-igen Sammelgel konzentriert und gelangten dann in das 10%-ige Trenngel. Verwendet wurde das Mini-ProteanII-System von Biorad. Als Laufpuffer diente SDS 1x Laufpuffer.

20 µl der Proben wurden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt, 10 Min. auf 95°C erhitzt und direkt in die Laufaschen gegeben, nachdem diese in der Apparatur mit dem Laufpuffer gefüllt waren. Trennung erfolgte bei 200 V. In einem der beiden Gele wurden die Proteinbanden mit Coomassiefärbung und /-entfärbelösung sichtbar gemacht. Anschließend wurde dieses Gel zur weiteren Dokumentation zwischen zwei gewässerte Cellophan-folien gelegt (Gelair, Cellophan Support; Biorad) und in einem Gelrockner (Biorad) getrocknet. Das zweite Gel wurde im Western Blot analysiert.

### 2.8.2.2. Western Blot

Mit dieser Methode sollten im SDS-Gel aufgetrennte Proteine auf eine Membran transferiert und immobilisiert werden. Anschließende Entwicklung des Blots erlaubte die Detektion spezifischer Proteinbanden.

Mit der Transblot-Semidry-Transfer-Cell von Biorad wurde ein Semidry-Blot durchgeführt. Dazu wurde das Gel in Semi-dry Puffer 5 Min. äquilibriert, ebenso die zuvor durch Methanol aktivierte PVDF-Membran (Immobilon-P; Millipore). Whatman-Papier wurde ebenfalls im Puffer durchfeuchtet und auf die Kathodenplatte gelegt. Darauf folgten die Membran, das Gel, eine erneute Schicht Whatman-Papier und die Anodenplatte. Transfer erfolgte für 20 Min. bei 15V. Die Membran wurde ohne trocken zu werden direkt weiterentwickelt.

### Entwicklung der Blotmembran und Nachweis der gebundenen Proteine mit ECL

Im funktionalen Aktivitätsnachweis im Overlay Blot wurde die Bindung von rekombinantem GfI-Protein an Fibronectin überprüft. Die Entwicklung der Blotmembranen erfolgte mit der ECL Entwicklerlösung (ECL Western Blotting detection reagents; Amersham Bioscience). Bei dieser Methode ist der Zweitantikörper mit einer Horse-raddisch-Peroxidase gekoppelt, welche die Oxidation des Substrates Luminol der Entwicklerlösung katalysiert. Dabei wird Chemilumineszenz frei, welche mit einem Röntgenfilm als Bande zu detektieren ist.

Zunächst wurde der Blot ü.N. bei 4°C in 5% Milchpulver in PBS abgesättigt, am Entwicklungstag für eine weitere Stunde bei RT. Es folgte 3 x waschen mit PBST

(0.05% Tween 20) für 15, 5, und 5 Min. bei RT, mit Fibronectin (2 µg/ml) in 10 ml PBST für 1h inkubiert und erneut 3x gewaschen. Als zweiter Antikörper (1:5000 in PBST) fungierte ein anti-Fibronectin Antikörper, welcher mit Horse-raddish-Peroxidase (HRP) gekoppelt war (anti-Fibronectin-HRP, Sigma). Nach 1h Inkubation wurde erneut 3 x gewaschen, abschließend 1x mit PBS ohne Zusatz. Für die Entwicklung wurde der Blot 1 Min. in ECL-Entwicklerlösung geschwenkt, in Klarsichtfolie faltenfrei eingewickelt und für 10-60 Sek. ein Film (KODAK X-Omat) exponiert. Der Film wurde im Entwicklerbad G153 (10-60 Sek.), Stoppbad (30 Sek.) und im Fixierbad G354 (90 Sek.) (alle Lösungen von der Firma Agfa) entwickelt.

### **2.8.3. Abspaltung von GST und Reinigung des rekombinanten Proteins**

12 mg des unter 2.8.1. gewonnenen rekombinanten GST-Fusionsproteins (Gfbl-GST) wurden in 2 ml PBS mit 2 ml Protease-cleavage-Puffer, welcher 120 U PreScission Protease (Amersham Bioscience, 2U/µl) enthielt, versetzt und ü.N. gegen 3.5 l Protease-cleavage-Puffer dialysiert (Slide A-Lyzer 10.000 MW cut-off, 0.5-3 ml; Pierce). Am nächsten Morgen folgte erneute Dialyse mit frischem Protease-cleavage-Puffer (2 l) für 4h. Anschließend wurde mit 1 ml Gelbettvolumen Glutathion-Sepharose (Amersham Bioscience) für 2h bei 4°C im direkten Batchverfahren inkubiert. Dieser Schritt bindet das abgespaltene GST und entfernt es aus der Lösung. Der Überstand wurde nach 5 Min. Zentrifugation bei 500 rpm in einen Slide A-Lyzer (Slide A-Lyzer 10.000 MW, 0.5-3ml; Pierce) überführt und ü.N. gegen PBS bei 4°C dialysiert. 20 µl Probe eines jeden Schrittes wurden zur Überprüfung der Reaktion im SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

### **2.8.4. Generierung von Serum gegen rekombinantes GST-Gfbl- Protein**

Gegen das rekombinante Fusionsprotein GST-Gfbl aus 2.8.3. wurden von der Firma SeqLab (Sequence Laboratories, Göttingen) polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen gewonnen. Der GST-tag diente in diesem Fall als Adjuvants.

### **2.8.5. Funktionaler Aktivitätsnachweis im Immunoblot (Dot blot)**

Die Dot-Blot-Analyse diente dem schnellen Nachweis und der Funktionsfähigkeit von in einer Lösung befindlichen Proteinen ohne vorherige Auftrennung und unter nativen Bedingungen. In diesem Versuch wurde das von der Firma SeqLab (s.2.8.4.) erhaltene Serum gegen rekombinantes Gfbl-Protein getestet. Dazu wurden 5 µg des Proteins Gfbl mit GST-tag, Gfbl nach Abspaltung des GST-tags und das gereinigte GST-tag auf eine aktivierte PVDF-Membran (Immobilon-P; Millipore) getropft. Nach Trocknung wurden

die Proteine bei 65°C für 20 Min. auf der Membran fixiert. Die Entwicklung erfolgte wie nach einem Western Blot (2.8.2.2.), allerdings wurden als Erstantikörperlösung die 1:100 verdünnten Seren (Präimmunserum, Serum der ersten Blutung, Serum der finalen Blutung) verwendet. Als Zweitantikörper fungierte ein Ziege-anti-Kaninchen AK (Sigma, s.2.3.) in einer Verdünnung von 1:5000. Dieser war ebenfalls wie im Western Blot Peroxidase gekoppelt.

#### **2.8.6. Säulenchromatographische Aufreinigung von Serum-IgG**

In diesem Verfahren wird die starke Wechselwirkung zwischen dem Fc-Teil der Antikörper und dem Protein A ausgenutzt. Protein A ist ursprünglich ein membrangebundenes, AK-bindendes Oberflächenprotein und wird aus *Staphylococcus aureus* gewonnen. Protein A ist kovalent an das Gelbett gebunden und die im Säulendurchlauf gebundene Antikörper können anschließend über einen pH-Wechsel in den sauren Bereich eluiert werden. Dazu wurde die Säule mit PBS äquilibriert, die Antikörperlösung aufgetragen und mit PBS gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden mit Glycinpuffer (0.1M, pH 3.0) eluiert und in Eppendorftubes aufgefangen. Zur Lagerung der Antikörper bei neutralem pH-Wert wurden zur Neutralisierung 150 µl Kaliumphosphatpuffer (1M; pH 8.0) in den Eppendorfgefäßen vorgelegt. Danach erfolgte die Reinigung der Säule mit HCl (0.1M) und Äquilibrierung mit PBS. Die Pumpengeschwindigkeit betrug 1.2 ml/Min., die Schreibergeschwindigkeit 2 mm/Min. Die Konzentration der gewonnenen AK wurde photometrisch bei OD 260 nm und 280 nm bestimmt.

#### **2.8.7. Gewinnung spezifischer Antikörper gegen GfbI mittels Kopplung von rekombinantem GfbI an CNBr-Sepharose**

Streptokokken der Gruppe G verfügen über ein sehr hohes Potential an unspezifischer Antikörperbindung über deren Fc-teil an diverse bakterielle Oberflächenproteine. Dies verfälscht die Ergebnisse in der Doppelimmunfluoreszenz, als auch bei den Inhibierungsstudien. Zur Eliminierung von unspezifischen Serumkomponenten und Antikörpern, die gegen den GST-tag gerichtet sind, wurden die Seren über eine GfbI-gekoppelte CNBr-Sepharose gegeben. Dadurch wurden speziell Antikörper gegen das rekombinante Protein GfbI aufgereinigt und somit die Spezifität der Antikörper bei der Detektion von GfbI erhöht.

20 mg rekombinantes Protein aus 2.8.3. wurde ü.N. umgepuffert bei 4°C gegen 3 l Coupling-Puffer. 1 g CNBr-aktivierte Sepharose (CNBr-aktivierte Sepharose<sup>TM</sup> 4B,

Amersham Bioscience) ergaben in HCl (1mM) gelöst 3.5 ml Gelbettvolumen, welche 15 Min. in HCl (1mM) rollernd gewaschen wurden. Nach Pellettieren des Gelbettes bei 600 rpm für 5 Min. wurde dies mit Proteinlösung vermischt und ü.N. bei 4°C leicht schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Mini-Säule bepackt, mit 5-fachem Volumen des Gelbettes mit Coupling-Puffer gewaschen, mit Tris-HCl (0.1M, pH 8.0) versetzt und für 2 h bei RT inkubiert. Mit jeweils dem 5-fachen Gelvolumen wurde die Säule in 3 Zyklen alternierend mit Puffer R1 und R2 gewaschen. Die Säule wurde direkt mit dem Startpuffer der AK-Reinigung versetzt.

12 ml Antikörperserum von SeqLab (Sequence laboratories, Göttingen; s.2.8.4. und 2.8.5.) wurden über eine spezifische Absorption an 5 ml Gfbl-gekoppelter CNBr-Sephrose aufgereinigt. Dabei wurde exakt das Verfahren wie unter 2.8.6. beschrieben angewendet, da das Protein kovalent an die CNBr-Sephrose gekoppelt war und ein pH-Wechsel zur Eluierung der AK möglich war.

#### **2.8.8. Kopplung von rekombinantem Protein an Latex-Beads**

Verwendet wurden Latex-Beads von Sigma mit etwa  $6.7 \times 10^9$  Beads/ml  $\varnothing = 3 \mu\text{m}$  (LB-30).  $10^8$  Latex-Beads (15  $\mu\text{l}$ ) wurden mit PBS auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, 2x durch Auf- und Abpipettieren mit einer blauen 1000  $\mu\text{l}$  Spitze gewaschen, wobei zwischendurch 2x für 5 Min. bei 600 rpm (Biofuge 15; Heraeus) zentrifugiert wurde. Die Latex-Beads wurden anschließend in 50  $\mu\text{l}$  PBS resuspendiert, mit 5  $\mu\text{g}$  rekombinantem Protein Gfbl versetzt und ü.N. bei 4°C schwenkend inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Beads mit 1 ml PBS gewaschen, nach Zentrifugation in 1 ml PBS aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Als Negativkontrolle diente eine Inkubation der Beads ohne Protein. Die Kopplung wurde mittels FITC-Fluoreszenzfarbstoff markierter Antikörper im Durchflußzytometer (FACScan; Becton Dickinson) unter Anwendung der Software Cellquest verifiziert. Dazu wurden 50  $\mu\text{l}$  der Beads je Inkubation 1h bei RT in 200  $\mu\text{l}$  PBS mit 10% BSA abgesättigt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgte 2-maliges Waschen mit PBS und Zentrifugation bei 600 rpm für 5 Min. Im ersten Schritt wurden 50  $\mu\text{l}$  des 1. Antikörpers anti-Gfbl-GST (s.2.8.6.) 1:100 in PBS+10%FCS verwendet und 30 Min. bei 4°C inkubiert. Als 2. Antikörper fand ein 1:100 in PBS mit 10%FCS verdünnter Ziege-anti-Kaninchen, FITC gekoppelter Antikörper Verwendung. Dieser wurde für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Beads in 50  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und per FACS-Analyse untersucht. Als Negativkontrollen fungierten Latex-Beads ohne Protein und LB jeweils nur mit dem 2. Antikörper inkubiert.

## 2.9. Invasionsversuche in der Zellkultur

Das Adhärenz- und Invasionspotential des Fibronektin bindenden Proteins Gfbl wurde im Invasionsversuch mit Hilfe von Latex Beads, welche mit dem Protein gekoppelt waren, untersucht. Ebenso das Verhalten der Stämme G59 und der entsprechenden Mutante TF59, sowie der Kontrollen A40 und A8 der *S. pyogenes* Isolate. In allen Versuchen wurde das Infektionsmedium 2h nach Beginn der Infektion gegen Infektionsmedium mit Penicillin (5µg/ml) und Streptomycin (50µg/ml) ausgetauscht, sofern die Inkubationszeit länger als 4h betrug. Beide Antibiotika besitzen bacterizide Wirkung. Für die Replattierungs- und Inhibierungsversuche wurde jeder Versuch als Triplett, für Doppelimmunfluoreszenz-Experimente zweifach angesetzt.

### 2.9.1. Infektion für DIF und REM

#### Vorbereitung der HEp-2-Zellen

Die Zellen wurden am Abend vor dem Versuch mit  $2.8 \times 10^5$  Zellen/ml in 24-er Well-Platten (Nunc), welche vorher mit Deckgläschen ( $\varnothing$  10 mm) bestückt wurden, ausgesät. Die Kultivierung erfolgte mit DMEM-Medium ü.N.. Die Zellen wurden 1 x mit HEPES-Medium gewaschen, 250 µl/well desselben in den Wells vorgelegt und die Zellen 60 Min. darin ruhen gelassen.

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurde eine konfluente bewachsene Petrischale, wie bei der Kultivierung (2.2.3.), abtrypsiniert, mit Zellmedium die Reaktion des Trypsins abgestoppt und 4 ml dieser Zelllösung in eine frische Petrischale mit 16 ml ü.N.-Infektionsmedium pipettiert. Anzucht der HEp-2-Zellen erfolgte ü.N..

#### Vorbereitung der Bakterien-Stämme

Eine ü.N.-Kultur der Bakterien wurde am Infektionstag 6 Min. bei 6000 rpm pellettiert (Biofuge R15; Heraeus), 2 x in 3 ml PBS gewaschen, in 600 µl PBS resuspendiert und anschließend in PBS bei einer  $OD_{600\text{ nm}}$  (im Photometer NovaspecII, PharmaciaBiotech) auf eine Transmission von 10 % eingestellt.

#### Vorbereitung der Latex-Beads

Für die Infektion von 4 Wells einer 24-er Well-Platte (Nunc) wurden 400 µl der bei 4°C gelagerten Beads abgenommen, bei 600 rpm für 3 Min. (Biofuge 15; Heraeus) zentrifugiert und 1 x mit 1 ml Infektionsmedium (DMEM-Hepes mit 1% FCS) gewaschen. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Beads in 1 ml Medium.



### **Infektion der Zellkultur mit Bakterien und Latex-Beads**

Die Kontroll-GAS-Stämme wurden in Infektionsmedium 1:80, die GGS-Stämme 1:130 verdünnt und je 250 µl der Infektionslösung zu den ruhenden HEP-2-Zellen gegeben. Der Infektionsansatz wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Inkubation mit den Latex Beads erfolgte mit 250µl/well der Latex-Beads (entspr. 10<sup>7</sup> Beads). Der Infektionsansatz wurde ebenfalls bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Die Infektionsdauer betrug für Adhäsion/Invasion, für Replattierungs- und Inhibierungsversuche 2 h und 4h und für Untersuchungen zur Zellmorphologie (REM) 0.5h, 1h, 2h, 3h, 4h und 6h.

Für die Kolokalisations-Experimente zur Invasion (2.11.1.) wurden die Infektionszeiten für die Versuche mit Transferrin und anti-Clathrin auf 30 Min. verkürzt. Für die anti-Lamp1-Detektion betrugen sie 2h und 4h .

### **Fixierung der Infektion für Doppelimmunfluoreszenz (DIF) und Raster-Elektronenmikroskopie (REM)**

Für die DIF wurden die Zellen und Bakterien nach 3-maligem Waschen mit PBS mit 1% PFA für 1h auf Eis fixiert und anschließend erneut 3x mit PBS gewaschen. Dies gilt auch für die Infektion mit den Latex Beads für die DIF.

Für die REM wurden die Deckgläschen mit Fixans (3% Glutaraldehyd, 5% Formaldehyd in Cacodylatpuffer) für 1h auf Eis fixiert, jedoch bis zur weiteren Verarbeitung im Fixans bei 4°C belassen, da nach dem Waschschrift mit Cacodylatpufer direkt die Entwässerung folgen musste (s.2.11.2.)

#### **2.9.2. Infektion für TEM**

Eine ü.N.-Kultur der Bakterien wurde wie unter 2.9.1. beschrieben zentrifugiert, gewaschen und auf 10% Transmission eingestellt, jedoch nur 1:10 in Infektionsmedium verdünnt, davon je 250 µl und 500 µl in 2 ml Infektionsmedium aufgenommen und in die Petrischalen zu den vorbereiteten HEP-2-Zellen (2.9.1.) pipettiert. Nach Ablauf der verschiedenen Infektionszeitpunkte (0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h) wurde 2x mit je 5 ml Cacodylat-Puffer gewaschen. Als Fixans dienten 2 ml Cacodylatpuffer mit 3% Glutaraldehyd und 5% Formaldehyd, welches für 1h auf Eis stehend belassen wurde. Weitere Aufarbeitung der Proben s.2.11.3.

### 2.9.3. Bestimmung der Adhäsions-und Invasionsrate von GAS und GGS (Tang *et al.*,1993)

In diesem Versuch sollte die Adhäsion an und die Invasion in humanen Epithelzellen von virulenten Stämmen untersucht werden. Dazu wurde ein Ansatz nach 2h ausplattiert (Adhäsion), während einem zweiten Ansatz (Invasion) Penicillin (5µg/ml) mit bakteriostatischer, und Gentamycin (100µg/ml) mit bakteriozider Wirkung zugesetzt wurde. Dies führte zum Abtöten der bis dahin noch extrazellulären, adhärenenten Bakterien. Intrazellulär befindliche Bakterien waren durch die Impermeabilität der Zellmembran vor den Antibiotika geschützt (Wilson *et al.*, 1982). Anschließende Permeabilisation und Ablösung der Epithelzellen mit 400 µl Triton-X-100 (0.025%) und 100 µl Trypsin führte zum Freisetzen der intrazellulären Bakterien, welche nach Ausplattieren in den Verdünnungen  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-5}$  auf THB-Agar quantitativ erfasst werden konnten. Der Wert nach 2h ergab sowohl adhärenente, als auch bereits invasive Bakterien, während der 4h Wert nach Antibiotika-Behandlung ausschließlich die intrazellulär überlebenden Bakterien widerspiegelt. Die Anzahl der Bakterien wurde als Kolonie-bildende-Einheiten (CFU, colony forming units) nach 30 - 40h nach dem Ausplattieren ausgezählt.

### 2.9.4. Inhibierungsversuche zur Adhärenz-und Invasion von GAS und GGS

In diesem Versuch sollten die Mechanismen und Auswirkungen von Zellwand-Veränderungen auf die Adhäsion und Invasion von Streptokokken untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden dem Versuch vor der Infektion mit Bakterien verschiedene Inhibitoren beigefügt. Unabhängig davon wurde der Versuch im weiteren Verlauf, exakt wie im Replattierungsversuch unter 2.9.3. beschrieben, durchgeführt. Zusätzlich wurden zur Kontrolle der Epithelzellmorphologie Doppelimmunfluoreszenzen angefertigt (2.11.1 Adhäsion/Invasion). Folgende Inhibitoren wurden verwendet:

#### 1. RGD-Peptid (Adhäsion)

Bei diesem Versuch wurden die Epithelzellen ü.N. in Medium mit nur 1% FCS statt mit 10% FCS hochgezogen, und das Infektionsmedium enthielt keinerlei FCS mehr. Pro Well wurden 25 µg/ well RGD-Peptid, (Sigma) 30-45 Min. vor Infektionsstart mit den HEp-2-Zellen inkubiert.

## **2. Spezifische Antikörper anti-GfbIspz (Adhäsion)**

Die aus der ü.N.-Kultur gewonnenen, mit PBS gewaschenen Bakterien wurden in PBS mit dem anti-GfbIspz-Antikörper versetzt, welcher vorher über eine Gfbl-Protein gekoppelte CNBr-Säule spezifisch aufgereinigt wurde (s.2.8.7.). Die Konzentration der Antikörperlösung betrug 25 µg/well (100 µg AK/ml). Die Vorinkubation erfolgte für 45-60 Min. rollend bei RT. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Bakterien auf 10 % Transmission eingestellt, 1:130 in Infektionsmedium verdünnt und direkt auf die Zellen gegeben.

## **3. Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) (Adhäsion + Invasion)**

MβCD (Sigma) wurde mit 10mM/well zu den ruhenden Zellen gegeben, 30 - 40 Min. mit den Zellen inkubiert, durch Waschen mit Infektionsmedium entfernt und die Infektion durch Zugabe der Bakteriensuspension gestartet.

## **4. Cytochalasin D (Invasion)**

20 µg/ml Cytochalasin D (Sigma) wurden 15 Min. vor dem Zupipettieren der Bakteriensuspension zusammen mit den ruhenden Zellen inkubiert.

## **5. Nocodazol (Invasion)**

Nocodazol (Sigma) wurde für 90 Min. vor der Infektion in einer Konzentration von 20 µg/ml auf die HEp-2-Zellen pipettiert.

## **6. Src-PP2 – ein Src-Kinase-Inhibitor**

Der Src-Kinase Inhibitor Src-PP2 (Calbiochem) wurde in einer Konzentration von 1µM/well 15 Min. vor Inkubationsstart zu den Zellen gegeben.

## **2.10. Bindungsversuche mit radioaktiv markierten Proteinen**

### **2.10.1. Radioaktive Markierung von Proteinen**

Die Proteine wurden nach der Methode von Hunter und Greenwood mit  $I^{125}$  radioaktiv markiert. Bei dieser Chloramin-T-Methode oxidiert das in wässriger Hypochlorsäure zersetzte Chloramin-T  $I^{125-}$  zu  $I^{125+}$ . Dieses jodiert die anionische Tyrosin-Form eines Proteins, wobei das Optimum der Reaktion bei pH7 liegt. Die zu markierenden Proteine wurden zuvor folgendermaßen gelöst:

1. 70 kDa-Fragment von Fibronectin (Sigma) : 0.5 mg in 500 µl PB-Puffer
2. Plasminogen (Sigma) : in 830 µl PBS gelöst, dies entspricht einer Konzentration von 1 mg/ml
3. Kollagen VI (Sigma) : in 0.1 M Eisessig gelöst und für den Versuch 1:1 in PB-Puffer auf eine Konzentration von 0.5 mg/ml gebracht
4. Laminin (Sigma) : bereits vom Hersteller in PBS in einer Konzentration von 0.5 mg/ml gelöst
5. Fibrinogen (Calbiochem) : bereits vom Hersteller in PBS als 2 mg/ml gelöst
6.  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Sigma) : gelöst in PB-Puffer, die Konzentration betrug 1 mg/ml

Anschließend wurden 100 µl (1mg/ml), in silikonisierte Röhrchen aliquotiert. Nach Zugabe von Iod<sup>125</sup> (0.25 mCi) und 20 µl Chloramin-T (1 mg/ml in PB-Puffer) erfolgte die Inkubation bei RT für 1 Min. Gestoppt wurde die Reaktion mit 20 µl Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1mg/ml in PB-Puffer) und anschließend mit PBST auf 2.5 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde über eine PD-10 Gelfiltrationssäule (Amersham) gegeben und das iodierte Protein mit 3.5 ml PBST eluiert.

#### 2.10.7. Bindungsversuche mit I<sup>125</sup>-markierten Proteinen

Eine ü.N.-Kultur der Bakterien in THB wurde bei 6000 rpm (Biofuge 15R, Heraeus) für 7 Min. zentrifugiert, 2x in PBS gewaschen und auf eine Transmission von 10 % eingestellt. 250 µl Aliquots wurden als Triplet in Eppendorfgefäße überführt und mit 100.000 cpm radioaktiv markiertem Protein vermischt. Die Inkubation erfolgte für 45 Min. bei RT. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 ml PBST abgestoppt, 7 Min. bei maximaler Umdrehung (Biofuge 15, Heraeus) zentrifugiert und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Pellet wurde im Wizard Automatic Gamma Counter (Wallac) gemessen. Über die Gesamtmenge des eingesetzten radioaktiven Proteins (100 %-Wert) wurde die prozentuale Bindungsaktivität bestimmt. Für Inhibierungsversuche zur Bindung des radioaktiven 70 kDa-Fragment von Fibronectin wurden die Bakterien wie unter 2.9.4. beschrieben mit Antikörpern vorinkubiert. Es wurden der anti-GfbIspz- und anti-SfbI-Antikörper, sowie polyklonale, unspezifische Kaninchen IgG jeweils in den Konzentration 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml verwendet.

## **2.11. Mikroskopische Untersuchungsmethoden und deren Vorbereitung**

### **2.11.1. Doppelimmunfluoreszenz (DIF) ) für Adhäsion/Invasion und Kolokalisations- Experimente**

#### **Adhäsion und Invasion**

Hierfür wurden die aus dem Infektionsversuch unter 2.9.1. beschriebenen Deckgläschen verwendet. Nach der Fixierung (s.2.9.1.) wurden die Deckgläschen 3 x mit PBS gewaschen und für 1h mit PBS+10% FCS bei RT abgesättigt. Für die farbliche Markierung sowohl der extrazellulären, als auch der intrazellulären Bakterien wurden zunächst die extrazellulären detektiert. Dazu erfolgte die Inkubation mit einem gegen das Isolat gerichteten, polyklonalen Erstantikörper aus dem Kaninchen (in PBS mit 10% FCS) für 45 Min. bei RT, dreimaliges Waschen mit PBS und Inkubation mit einem Zweitantikörper Ziege-anti-Kaninchen (Invitrogen). Dieser wurde 1:300 in PBS mit 10% FCS verdünnt und war Alexa-Fluor488 (grün) gekoppelt. Die Inkubation erfolgte für 45 Min. bei RT. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen zur Permeabilisierung der Zellmembran mit 0.1% TritonX-100 für 5 Min. bei RT behandelt und anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Zur Detektion der intrazellulären Bakterien wurde derselbe Erstantikörper für 60 Min. bei RT verwendet. Detektion für 60 Min. bei RT durch den Zweitantikörper erfolgte mit einem Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (Invitrogen), welcher Alexa-Fluor595 (rot) markiert und 1:400 (in PBS mit 10% FCS) verdünnt war. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläschen mit PBS und ein weiteres Mal mit dH<sub>2</sub>O, wurden sie auf einem Objektträger befindlichen Tropfen (5 µl) Moviol gebracht. Nach kurzer Trocknung wurden die Ränder mit klarem Nagellack (Manhattan; Schlecker) versiegelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert100; Zeiss) analysiert. Die photographischen Aufnahmen erfolgten mit der Mikroskopie Farbkamera AxioCam HRC von Zeiss.

#### **Kolokalisationsexperimente**

Für die Kolokalisationsexperimente wurden die fixierten Zellen (2.9.1.) zunächst mit Triton-X-100 5 Min. permeabilisiert. Als Erstantikörper wurden anti-Clathrin (mAb. Maus; 1:50 Verdünnung) oder anti-Lamp1 (mAb. Maus, 1:25 Verdünnung in PBS mit 10% FCS) (s.2.3.) verwendet. Beide Ansätze wurden im zweiten Schritt mit einem Ziege-anti-Maus, Alexa488-markiertem Antikörper (grün) inkubiert. Die Detektion der Bakterien erfolgte mit den GGS-spezifischen Antikörpern und einem Ziege-anti-Kaninchen, Alexa595-gekoppeltem Zweitantikörper (rot).

Für die Untersuchung zur Kolokalisation mit Transferrin wurden die HEp-2-Zellen 15 Min. vor der Infektion mit Transferrin-Alexa488 (0.5 mg/ml) bei RT inkubiert. Die

Detektion der Streptokokken erfolgte nach oben erwähnter Permeabilisierung wiederum mit den spezifischen GGS-Antikörpern und einer Markierung durch Alexa595-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (rot).

## **2.11.2 Raster-Elektronenmikroskopie (REM)**

### **2.11.2.1 Entwässerungsreihe**

Die Proben-Deckgläschen (s.2.9.1.) wurden im 24-er Well 15 Min. mit je 1 ml Aceton auf Eis inkubiert. Es wurde eine aufsteigende Entwässerungsreihe verwendet mit 10%, 30%, 50%, 70%, 90% und 100% Aceton. Letzteres wurde in Glasschälchen einmal auf Eis und einmal bei RT verwendet.

### **2.11.2.2 Kritische Punkttrocknung**

Die getrockneten Proben-Deckgläschen wurden in den Behälter für die kritische Punkttrocknung überführt, welcher vorher mit 100 %-igem Aceton befüllt war, um ein Trockenfallen der Proben zu verhindern. Dieser Behälter wurde dann in die Kammer des Gerätes gestellt (CPD030; Baltec) und Aceton gegen flüssiges Kohlendioxid ausgetauscht. Durch Erwärmen auf 41°C für 45 Min. und anschließendem Ablassen des gasförmigen CO<sub>2</sub> erfolgte die kritische Punkttrocknung.

### **2.11.2.3 Gold-Bedampfung (Sputtern)**

Bei dieser Methode wurden die getrockneten Deckgläschen mit einem dünnen Goldfilm bestäubt, um die Proben leitfähig zu machen. Verwendet wurde das Gerät SCD 040 von Baltec UNION.

### **2.11.2.4 Mikroskopische Analyse**

Die Analyse der Objekte erfolgte mit Hilfe des Zeiss Feldemissions-Rasterelektronenmikroskops DSM 982 Gemini. Es wurde eine Spannung von 5kV verwendet und die Kathode (Filament) mit 2535 mA betrieben. Die photographischen Daten wurden auf MO-Disketten gespeichert und mit dem Software-Programm Paintshop Pro 6.0 bearbeitet.

### **2.11.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)**

#### **2.11.3.1 Kontrastierung mit Osmium-Tetroxid**

Die zu untersuchenden Proben wurden nach der Fixierung ( s.2.9.3.) 1x mit Cacodylat-Puffer gewaschen. Danach wurde der fixierte Zellrasen mit einem Gummischaber von der Petrischale gelöst, in ein 2 ml Eppendorftube überführt und noch 2x mit Cacodylatpuffer unter Zentrifugation bei 5000 rpm (Biofuge Primo; Hareaus) für 8 Min. gewaschen. Die Zellen wurden in einer 1% OsO<sub>4</sub> –Lösung in Cacodylatpuffer 1h bei RT rollernd inkubiert und anschließend wiederum 3x mit Cacodylatpuffer gewaschen. Weitere Verarbeitung s. 2.11.3.2.

#### **2.11.3.2 Einbettung der Proben**

##### **Agareinbettung**

Die Proben aus 2.11.3.1. wurden zur besseren Handhabung in 2%-igem Agar eingebettet. Das Pellet aus dem letzten Zentrifugationsschritt wurde mit 50 µl 50 °C warmen Agar durchmischt und diese Lösung auf einen Objektträger zum Abkühlen gegeben. Die durch Zerschneiden gewonnenen Agarblöckchen (Ø 1 mm) wurden in Eppendorftubes überführt und entwässert.

##### **Entwässerungsreihe**

Zur Einbettung in Spurr-Harz wurde eine aufsteigende Entwässerungsreihe mit Aceton verwendet. Beginnend mit 10 % Aceton über 30%, 50%, 70%, 90% und 100% wurden je 2 ml Lösung auf die Agarblöckchen gegeben und für 15-30 Min. auf Eis inkubiert. Für den letzten Schritt mit 100 % Aceton erfolgte die Inkubation bei RT.

##### **Harzeinbettung/Polymerisation**

Um eine schonende Durchmischung und einen schonenden Austausch des Acetons gegen das Harz zu gewährleisten, wurden zunächst Aceton und Spurr-Harz 2:1 gemischt und ü.N. mit den Agarproben bei RT rollernd inkubiert. Am nächsten Morgen wurde diese Lösung gegen eine 1:1 Aceton:Spurr-Harz-Mischung ausgetauscht und über den Tag rollernd durchmischt. Am Abend erfolgte erneuter Austausch gegen 100% Spurr-Harz und Inkubation ü.N. Während der folgenden 4 Tage wurde das Harz täglich 1-2x gegen frische Harzlösung ausgetauscht. Zur Polymerisation wurden Gelatine kapseln (Operculata Nr.2, Pharmapol) halbvoll mit Harz gefüllt, die Agarblöckchen hineingegeben und die Kapseln mit Harz zu  $\frac{3}{4}$  gefüllt, um ein Überlaufen bei der folgenden Entgasung zu vermeiden. Anschließend wurden sie im Rezipienten mit einer Vakuumpumpe entgast und dann randvoll mit Harz aufgefüllt. Die Polymerisation erfolgte im Trockenschrank (Memmert) für 8h bei 75°C.

### 2.11.3.3 Fräsen der Präparate

Die Agarblöckchen wurden in das Gerät (Ultratrim-Reichert, Leica) eingespannt, eine gerade Anschnittfläche hergestellt, an der dann die Seiten trapezförmig zugefräst wurden. Entscheidend ist eine sehr ebenmäßige Anschnittfläche, um das Ziehen von Wasser bei der Ultramikrotomie zu vermeiden, sowie exakte Winkel, die ein Zerreißen des Schnittes vermeiden. Die maximale Kantenlänge eines Trapezes betrug auf der langen Seite 1 mm.

### 2.11.3.4 Ultramikrotomie

Für das Auffangen von Schnitten aus Spurr-Harz-Proben wurden 300 mesh Kupfer-Grids (Plano) verwendet. Um die Schnitte auf eine bei der Elektronenmikroskopie durchlässige und inerte Oberfläche zu bringen, wurden diese Grids zuvor mit Formvarfolie beschichtet. Dazu wurde ein Glasobjektträger mit Formvar 1.0% (w/v) in wasserfreiem Chloroform beschichtet, dieser auf einer Wasseroberfläche abflottiert und mit den Kupfer-Grids belegt. Mit Hilfe eines Filterpapiers konnte der belegte Formvarfilm faltenfrei aufgetupft, getrocknet und in Petrischalen aufbewahrt werden.

Um für die Ultramikrotomie geeignete Messer herzustellen, wurden Glasstreifen (6mm, Plano) mit dem Knifemaker (Reichert-Jung) angeritzt und gebrochen.

Vorgefertigte Tröge (LKB, 2208-100, TRUF) wurden mit Wachs wasserdicht an die Messer geklebt, anschließend mit Wasser befüllt und im Ultramikrotom (Reichert Ultracut S, Leica) angebracht. Die Probe wurde mit 2.5 mm/Sek. 90 nm dünn geschnitten, und die silbrig-goldenen Ultradünnschnitte im Trog als Band gesammelt, bevor 4-5 Schnitte mit einem Kupfer-Grid aufgetupft wurden. Mit der Oberfläche nach oben wurden sie anschließend an der Luft getrocknet und bis zur Mikroskopie trocken in Petrischalen aufbewahrt. Nach Überprüfung im TEM erfolgte nach Bedarf eine Nachkontrastierung wie unter 2.11.3.5. beschrieben.

### 2.11.3.5 Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat

Bei der Nachkontrastierung handelt es sich um eine Kontrastierung, bei der die Schwermetalle nachträglich auf die geschnittenen und auf Grids befindlichen (2.11.3.4.) Objekte gebracht werden. Bei dieser Methode werden generell die Membranen der Objekte nochmals deutlich hervorgehoben. Dazu wurde eine kombinierte Doppelkontrastierung mit Uranylacetat (4% in H<sub>2</sub>O) und Bleicitrat durchgeführt. Die trockenen Grids mit den Schnitten wurden 4 Min. auf einen Tropfen Uranylacetat gelegt, anschließend durch mehrmaliges Eintauchen in Wasser gewaschen und unter einer



Lampe getrocknet. Direkt im Anschluß wurden die Tropfen für 1-2 Min. auf einen Tropfen Bleicitratlösung gelegt. Dies musste in CO<sub>2</sub>-armer Atmosphäre erfolgen, daher wurden die Tropfen auf eine dreigeteilte Petrischale, in der sich NaOH-Plätzchen befanden, gegeben und mit einem Deckel verschlossen. Die Grids wurden dann auf Wassertropfen durch leichte Bewegung gewaschen und erneut getrocknet, bevor sie im Elektronenmikroskop analysiert wurden.

#### **2.11.3.6 Mikroskopische Analyse**

Die Analyse der vorbereiteten Proben erfolgte mit einem Zeiss Transmissionselektronenmikroskop EM910. Die Beschleunigungsspannung betrug 80 kV. Die Aufnahmen entstanden bei 8.000-50.000-facher Vergrößerung auf Agfa Scientia Negativfilmen. Diese wurden im Photolabor als Negative mit Lösungen von AGFA entwickelt. Die Positiv-Aufnahmen wurden auf Ilford-Photopaier Papier gemacht und mit den Lösungen von Ilford (Multigrade, IN-1) entwickelt. Anschließend wurden die Bilder eingescannt, um sie der digitalen Bildbearbeitung mit dem Programm Paintshop Pro zugänglich zu machen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1. Identifizierung des für die Fibronektinbindung verantwortlichen Genes im Stamm G59

Fibronektin ist ein ubiquitäres Protein der humanen extrazellulären Matrix. Es kommt sowohl in immobilisierter Form im Bindegewebe, als auch in löslicher Form in den Körperflüssigkeiten vor. Es ist bekannt, dass *S. pyogenes* (GAS) Fibronektin bindet, und diese Bindung hauptverantwortlich für die Adhäsion und Invasion ist (Talay *et al.*, 1992).

##### 3.1.1. Identifikation von Fibronektin bindenden GGS im radioaktiven Bindungsversuch (I<sup>125</sup>-markiertem Fibronektin 70 kDa Fragment)

Ziel dieses Versuches war es, ein Isolat der GGS zu finden, welches Fibronektin bindet. Dazu wurden 5 humanpathogene, australische Isolate aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe ausgewählt (2.1.). Die Wahrscheinlichkeit ein Isolat zu finden, welches Fibronektin bindet, war relativ hoch, da ca. 70 % der GGS-Isolate aus der Stammsammlung der GBF positiv auf Fibronektinbindung getestet worden waren. Desweiteren fanden Kline *et al.* (1996) bei 36% aller von ihnen untersuchten GGS-Isolate eine Bindung an Fibronektin. Die Auswahl der Isolate G31, G32, G33, G48, G59 aus dem Bestand der Arbeitsgruppe erfolgte willkürlich. Die Isolate wurden im radioaktiven Bindungsversuch mit dem 70kDa-Fragment des Fibronektins (2.10.) analysiert. Dieses Protein-Fragment besitzt die Bindungsstellen für das Fibronektin bindende Protein SfbI von *S. pyogenes* (Talay *et al.*, 1992) und es konnte nachgewiesen werden, dass dies sowohl für die Adhäsion, als auch für die Invasion verantwortlich ist.

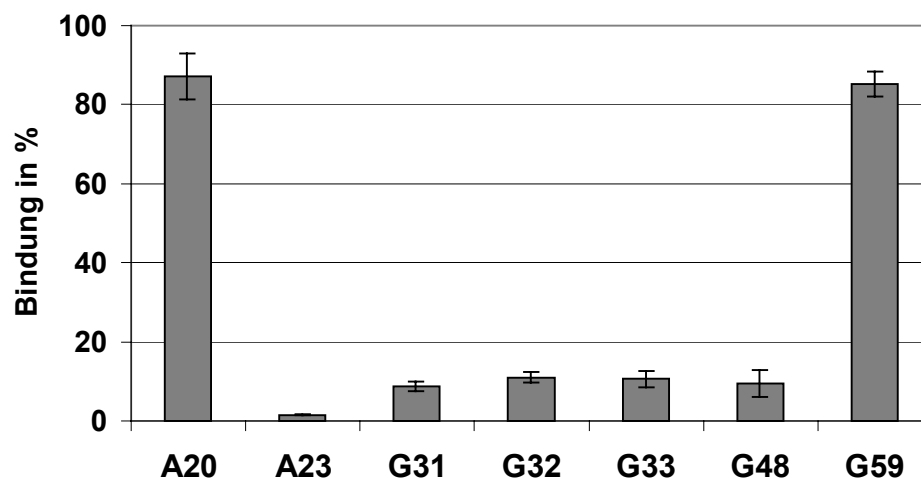
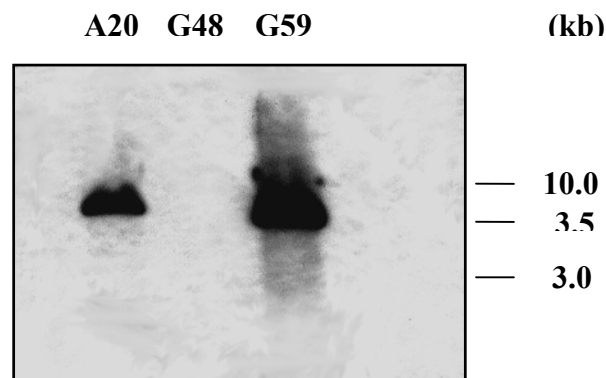


Abb.1: Bindung von I<sup>125</sup>-markiertem Fibronektin 70 kDa Fragment. A20 = positiv Kontrolle; A23 = negativ Kontrolle

Von den ausgewählten 5 Stämmen war, wie aus Abb.1 ersichtlich, nur das Isolat G59 in der Lage, Fibronectin zu binden. Alle Versuche wurden jeweils an verschiedenen Tagen im Triplet durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das Isolat *S. pyogenes* A20 (DSMZ 2071) gewählt, welches als Fibronectin bindender Stamm (SfbI positiv) vollständig charakterisiert wurde (Talay *et al.*, 1992). Das *S. pyogenes* Isolat A23 verfügt nicht über das Protein SfbI, kann kein Fibronectin binden und diente somit als Negativkontrolle.

### 3.1.2. Detektion des für die Fibronectinbindung verantwortlichen Gens mittels Southern Blot- Hybridisierung

Aus dem Gruppe A Isolat A20 wurde das für die Fibronectinbindung verantwortliche Gen *sfbI* isoliert und charakterisiert (Talay *et al.*, 1991, 1992; Molinari *et al.*, 1997). Zur Detektion wurde eine DIG-markierte Sonde gegen das gesamte *sfbI*-Gen aus diesem Isolat gewonnen (2.7.5.). Mit dieser Sonde sollte ein SfbI-Homolog in GGS gefunden werden. Die isolierte und mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaute chromosomale DNA der Stämme A20, G48 (als Negativkontrolle) und G59 wurde im Southern Blot untersucht.



**Abb.2: Detektion des Fibronectin bindenden Genes im Stamm G59** über Hybridisierung einer Sonde gegen das gesamte *sfbI* Gen aus dem *S. pyogenes* Stamm A20. Verdau der chromosomalen DNA erfolgte mit *EcoRI/HindIII*. Als Marker wurde der DNA-ladder-Mix (Genruler) verwendet. Das Isolat G48 diente als Negativkontrolle.

Die verdaute chromosomale DNA des G48-Isolates zeigte keine Hybridisierung. Die hergestellte Sonde detektierte sowohl das Gen im A20-Isolat, als auch ein Genfragment im zu untersuchenden Isolat G59. Daraus ergibt sich, dass ein *sfbI*-Homolog im Fibronectin bindenden G59-Isolat existiert. Dieses Homolog wird im folgenden mit *gfbI* bezeichnet.

### 3.1.3. Klonierung, Sequenzierung und anschließende Sequenzvergleiche mit bekannten Genen

Für weitere Untersuchungen wurde das detektierte Gen (*gfbI*) isoliert. Dazu wurde das Gen mit den Primern SF1/SR1 aus der chromosomalen DNA des Streptokokken Isolates G59 amplifiziert und in den Vektor pCR2.1 ligiert (s.2.7.12.1.). Anschließend Sequenzierung durch das Sequenzier-Einheit der GBF mit den Primern SF1, SF3, 5A', PCR9, PCR1, und SR1 (s.2.4.) ergab die Sequenz wie in **Abb.3** dargestellt. Die erhaltenen DNA- Sequenzen wurden mit den Programmen DNASTAR von Lasergene (EditSeq, SeqManII, MegAlign) aufgearbeitet.

Eine Vielzahl von Fibronektin-Bindungsproteinen wurden bislang charakterisiert. Dazu zählen die homologen Proteine SfbI (Talay, 1992) und das F1-Protein (PrtF-Protein) (Hanski, 1992) für Gruppe A Streptokokken. Für Gruppe G Streptokokken ist bis heute jedoch nur das Protein GfbA bekannt, welches hohe Sequenzhomologien zu den genannten Proteinen der Gruppe A Streptokokken aufweist (Kline *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurde mit der aus dem Gen *gfbI* erhaltenen DNA-Sequenz ein Vergleich in der Datenbank durchgeführt, um Homologien zu bekannten Genen herauszufinden. Dabei fanden in der Internetdatenbank Pubmed die Programme BLASTN und FASTA des National Center for Biotechnology Information (NCBI) für Sequenzvergleiche Verwendung. Zum Vergleich dieser DNA-Sequenzen und um Unterschiede in den Genstrukturen herauszuarbeiten, wurden Alignments mit den Sequenzen des *sfbI*-Genes aus *S. pyogenes* (AccNo. X67947) und des *gfbA*-Genes aus Streptokokkus Gruppe G (AccNo. U31115) nach der Megaligne/Clustal W (Slow/Accurate, IUB)-Methode durchgeführt.

#### Vergleich der Sequenzen auf DNA-Ebene

```

1  ATGTTTTTGAGAGGAGAGAAAAATGAATAACAAAATGTTTTGAATAAAGAAGCCGGTTTTTGGCACACACAAAAAGAAA  gfbI
1  ATGTTTTTGAGAGGAGAGAAAAATGAATAACAAAATGTTTTGAACAAAGAAGCCGGTTTTTGG---CACACAAAAAGAAA  gfbA
1  ATGTTTGTGAGAGGAGAGAAAAATGAATAACAAAATGTTTTGAACAAAGAAGCCGGTTTTTGGCACACACAAAAAGAAA  sfbI

81  AAGGCGATTGCTGTCACTTTAGTGGGAGTCTTTTTATGCTTTTGGCATGCGCGGGTGCTATCGGTTTTGGTCAAGTAG  gfbI
78  AAGGCGATTGCTGTCACTTTAGTGGGAGTCTTTTTATGCTTTTGGCATGCGCGGGTGCTATCGGTTTTGGTCAAGTAG  gfbA
81  AAGGCGATTGCTGTCACTTTAGTGGGAGTCTTTTTATGCTTTTGGCATCCGCGGGTGCTATCGGTTTTGGTCAAGTAG  sfbI

161  CCTATGCTGCCGATGAGAAGACAGTGCCGAATTTATCTAGTCCAAATCCTGAGTTTCCTTGGTATGGTTATGATGCTTAT  gfbI
158  CCTATGCTGCCGATGAGAAGACTGTGCCGAATTTTAAAAGCCAGATCCAGATTATCCCTGGTATGGCTATGATGCTTAT  gfbA
161  CCTATGCTGCCGATGAGAAGACTGTGCCTCATAGAGTTAGTCAAAATCCTGAGTTTCCTTGGTATGGTTATGATTTCTAC  sfbI

241  GGTAAGGGGTATCCTGGATATGATATCAGTAAGTATTATCATGATTTAAGGGTAAATCTAAAGGGAAGTAAGGAATATCA  gfbI
238  ---ACTGG--AGCGTTTTTAAGATATCA-----T-----GATTAAATGTTAATTTGGAAGGTAGCACGCCTTACCA  gfbA
241  ---AAAGG--ACCTTACACAAGATATCA-----T-----AATTACAGCTAAATCTCAACGGAAGTAAACATATCA  sfbI

321  AGTTTATTGCTTTAACCTAAATAAAAGTTTTCTTATAGAGTAAATAGTAGTGCAAAAAATGGTATAAAAGATTAGAGG  gfbI
300  AGTTTATTGCTTTAATTTAGTAAGACAGGAACCGAGTAAGGTTAATGGTTTCAGAAATTCGGTTCAAAAAAGTTGATG  gfbA
303  GGCTTATTGTTTTAATTTAAAGAGATTTGAACCTAAGAAAGAAGGTAGTTATTTCCGAATTGGTATAAGAGGTGGGATG  sfbI

401  GAACTGCTGAAACTTTTAAAGTTCATGCTGATGGCTCCAGAGTAGG-----AGGAGAGGAAGTA  gfbI
380  GTGATAATGCTGTGTTTAAACAATATGCAGCTAATCCTAGAGTAATT-----GATGGAGATTTA  gfbA
383  GTAGTGAAGAGACATTTGTAAATATGCTGATAACCCAGAAAAGATAATGAAAGTTCAGAGTTATAGATGTAGAATTA  sfbI

```

460 ACTAAAAAATTACGGAGCGTTATGTATAACGGCTACCCTAATGACGGCAATAATATTATGAAAGATTTGGAGCCTTTAAA *gfbI*  
439 GAACGTAACATTTTAAATGTAATTTACAATGGATATCCAAGTGATGCAAAATGGGATTATGAAGGGATTGGACCGGTACAA *gfbA*  
463 GAAAAAATATATTAAGAGTGCTATATAATGGATATCCGAATAACGGTAATGGAATCATGGAGGGTTTAGAACCATTTAAA *sfbI*

540 TGCTATAGAAGTAACACAACACGCAGTTTGGTACTATTTCAGATAATTCAC--ATTATCAA-ATTGAGACAYTATGGGAGT *gfbI*  
519 TGCTATTTTAGTAACCTAACTGCGATTGGTATTATTCTGATAACTCAAA-GTTTATAG--TGGATGAACAGTGGAGT *gfbA*  
543 TGCTATCTTAGTAACCTAAATGCTGTTGGTACTATTCTGATAATTCATCTATTTTAACTACTGATAACTTCTTTACGA *sfbI*

617 CTGAAGCGAAAAAGGTGAGATTAGTAGAGAACAAGTAAATTTGATGCGAAAAGCATTAAAGAAGTTAATAGATCCAGAA *gfbI*  
596 CTGAATTAAGAGATGGAGAAATTAGCGAAAGTCAAGTAAAGTTAATGCGTGATGCTCTTAGAAAATTAATATCACCAGAT *gfbA*  
623 CTGAAGCTAAAGATCTTAATATAAAACCTGAGCAATTATCATTAATGCGTGTTGCATTAAAGAAATTGATAGATCCTAAG *sfbI*

697 TTAGAGCAAAAA-----GTACCAAATGATTATCAATTGAATATTTTGAATCTTTGGATTCAACATACCAACA *gfbI*  
676 TTAGAAAAACAGTCAAAATCAGTTGCCTGAGAATTATAAGTTAAATCTTTTATTTCAAAAGATAACTCGATTCAAAA *gfbA*  
703 TTATCTGAAGAATCATTGAACCTGTGCCATCTACTTTTAGACTGAATATTTTCGAATCTCAGGATAAGCTATATCAAAA *sfbI*

765 CCTTTTGAGTGCAGAGTTTGTACCAAACAATCCCCCTAAAACCTGGAGAA--ACCCGAGAATACGGACCTAAAAC----- *gfbI*  
756 TTTATTGAGTACTGAGTATGTACAAGATAACCTCCAAAAACCAGGTGAAGAACCCTAAAGAGGAGAGTCCAAAAGAAGAGA *gfbA*  
783 TCTTCTAAGTGCTGAGTTTGTACCAGAAAATCCCCCTAAACCTGGTGAA--ACCCCTGAACATGGACCCAAAAC----- *sfbI*

837 -TCCCGAGTTGGATGGTAGTCCTATTCTGAAGACCCAAAACATCCAGATGAAAATTCAGAACCTACATTGCCGCCAGTG *gfbI*  
836 ACCCCAAAATTCAGATTTAGATGGGCATGAAATCCCGAAGTTCACAGAACCCTCAGACCCAGTTATCCACCCGGTT *gfbA*  
855 -TCCCGAGTTGGATGGCACTCCAATTCCCGAAGGCCCAACAGTCCAAATGAGAGTTTAGAACCTACGCTTCCACCAGTG *sfbI*

916 ATGCTAGA----- *gfbI*  
916 ATTTTGGA----- *gfbA*  
934 ATGCTAGACGGACAAGAAGTCCCCGAAGTTCCAAGTGAGAGCTTAGAACCTGCGCTTCCCCATTGATGCCAGAGCTAGA *sfbI*

924 TGGTGAAGAAGTCCCAGAAGTTCCAAGCGAGAGCTTAGAACCTGCGCTTCCTCCATTAATGCCAGAACTAGATGGTCAAG *gfbI*  
924 TGGTGAAGAAGTCCCAGAAGTTCCAAGCGAGAGCTTAGAACCTGCGCTTCCTCCATTAATGCCAGAGTTAGATGGTCAAG *gfbA*  
1014 TGGCCAAGAAGTCCCAGAAGTTCCAAGCGAGAGCTTAGAACCTGCGCTTCCCCATTGATGCCAGAGTTAGATGGTCAAG *sfbI*

1004 AAGTCCCAGAAAAACCTAGTGTTGACTTACCTATTGAAGTTCTCTCGTTATGAGTTTAAACAATAAAGACCAATCGCCTCTA *gfbI*  
1004 AAGTCCCTGAAAAACCTAGTATTGACTTACCTATTGAAGTTCTCTCGTTATGAGTTTAAACAATAAAGACCAATCGCCTCTA *gfbA*  
1094 AAGTCCCTGAAAAACCTAGTGTTGACTTACCTATTGAAGATCTCTCGTTATGAGTTTAAACAATAAAGACCAATCACCTCTA *sfbI*

1084 GCGGGTGAGTCTGGTGAGACGGAGTATATTACCGAAGTCTATGGAAATCAACAGAACCCTGTTGATATTGATAAAAAACT *gfbI*  
1084 GCGGGTGAGTCTGGTGAGACGGAGTATATTACCGAAGTCTATGGAAATCAACAGAACCCTGTTGATATTGATAAAAAACT *gfbA*  
1174 GCGGGTGAGTCTGGTGAGACGGAGTATATTACCGAAGTTTATGGAAATCAACAGAACCCTGTTGATATTGATAAAAAACT *sfbI*

1164 TCCGAATGAACAGGTTTTTCAGGAAATATGGTTGAGACAGAAGATACGAATGAGCCAGAAGTGTTGATGGGAGGTCAAA *gfbI*  
1164 TCCGAATGAACAGGTTTTTCAGGAAATATGGTTGAGACAGAAGATACGAAAGAGCCAGAAGTGTTGATGGGAGGCCAAA *gfbA*  
1254 TCCGAATGAACAGGTTTTTCAGGAAATATGGTTGAGACAGAAGATACGAAAGAGCCAGGAGTGTTGATGGGAGGTCAAA *sfbI*

1244 GTGAGTCTGTTGAATTTACGGAAGACACTCAAACAGGCATGAGTGGTCAAACAACCTCTCAGGTTGAGACAGAAGATACG *gfbI*  
1244 GTGAGTCTGTTGAATTTACGAAAGACACTCAAACAGGCATGAGTGGTCAAACAACCTCTCAGGTTGAGACAGAAGA---- *gfbA*  
1334 GTGAGTCTGTTGAATTTACTAAAGACACTCAAACAGGCATGAGTGGTCAAACAACCTCTCAGGTTGAGACAGAAGACAG *sfbI*

1324 AAAGGGCCAGAAGTGTTGATGGGAGGCCAAAGTGAGTCTGTTGAATTTACTAAAGATACTCAAACAGGCATGAGTGGTCA *gfbI*  
1320 ----- *gfbA*  
1414 AAAGAGCCAGGAGTGCTGATGGGAGGTCAAAGTGAGTCTGTTGAATTTACCAAAGATACTCAAACAGGCATGAGTGGTCA *sfbI*

1404 AACAGCTCCTCAGGTTGAGACAGAAGATACGAAAGAGCCAGGAGTATTGATGGGAGGTCAAAGTGAGTCTGTTGAATTTA *gfbI*  
1320 -----TACGAAAGAGCCAGGAGTGTTGATGGGAGGTCAAAGTGAGTCTGTTGAATTTA *gfbA*  
1494 AACAGCTTCTCAGGTTGAGACAGAAGATACGAAAGAGCCAGGAGTGCTGATGGGAGGCCAAAGTGAGTCTGTTGAATTTA *sfbI*

1484 CGAAAGACACTCAAACAGGCATGAGTGGTCAAACAACCTCTCAGGTTGAGACAGAAGACACGAAAGAGCCAGGAGTATTG *gfbI*  
1373 CGAAAGATACTCAAACAGGCATGAGTGGTCAAACAACCTCTCAGGTTGAGACAGAAGATACGAAAGAGCCAGGAGTGTTG *gfbA*  
1574 CTAAAGACACTCAAACAGGCATGAGTGGTCAAACAACCTCTCAGGTTGAGACAGAAGACACGAAAGAGCCAGGAGTATTG *sfbI*

```

1564 ATGGGAGGTCAAAGTGAGTCTGTTGAATTTACGAAAGACACTCAAACAGGCATGAGTGGTTTCAGTGAAACAATGACTGT gfbI
1453 ATGGGAGGTCAAAGTGAGTCTGTTGGATTTACGAAAGACACTCAAACAGGCATGAGTGGTTTCAGTGAAACAGCGACTGT gfbA
1654 ATGGGAGGTCAAAGTGAATCTGTTGAATTTACTAAAGACACTCAAACAGGCATGAGCGGTTTCAGTGAAACAGTGACCAT sfbI

1644 TGTTGAAGATACCCGTCCGAAGTTAGTGTTCATTTTGACAATAATGAGCCCAAAGTGGAAGAGAATCGGGAAAAGCCTA gfbI
1533 TGTTGAAGATACGCGTCCGAAGTTAGTGTTCATTTTGACAATAATGAGCCCAAAGTGGAAGAGAATCAGGAAAAACCTA gfbA
1734 TGTTGAAGATACCCGTCCGAAGTTAGTGTTCATTTTGACAATAATGAGCCCAAAGTGGAAGAGAATCGGGAAAAGCCTA sfbI

1724 CAAAAAATATAACACCTATCCTTCCTGCAACAGGAGATATTGAGAATGTTTTGGCCTTTCTTGGAATCCTTATTTTGTC gfbI
1613 CAAAAAATATAACACCTATCCTTCCTGCAACAGGAGATATTGAGAATGTTTTGGCCTTTCTTGGAATCCTTATTTTGTC gfbA
1814 CAAAAAATATAACACCTATCCTTCCTGCAACAGGAGATATTGAGAATGTTTTGGCCTTTCTTGGAATCCTTATTTTGTC sfbI

1804 GTACTTCCTATTTTTAGTCTTTTAAAAAA-CAAACAAAACAATAAAGTCTGA gfbI
1693 GTACTTCCTATTTTTAGTCTTTTAAAAAA-CAAACAAAACAATAAAGTCTGA gfbA
1894 GTACTTCCTATTTTTAGTCTTTTAAAAAAACAAACAAAACAATAAAGTCTGA sfbI

```

### Abb.3: Alignment-Bericht der DNA-Sequenzen von *gfbI*, *sfbI* und *gfbA*.

Der Datenbankvergleich ergab hohe Homologien des gefundenen Gens *gfbI* mit den Genen *sfbI* (Talay *et al.*, 1992) und *gfbA* (Kline *et al.*, 1996).

### Homologien der DNA- Sequenzen in %

Die Sequenzen der drei verschiedenen Gene unterteilen sich in einen variablen Teil (1-939 bp für *gfbI*) und in einen konservierten Teil (940–1865 bp für *gfbI*). Eine exaktere Analyse der einzelnen Bereiche ergab unterschiedliche Homologien wie sie in Abb.4 dargestellt sind. Es wurden jeweils 2 Gene miteinander verglichen.

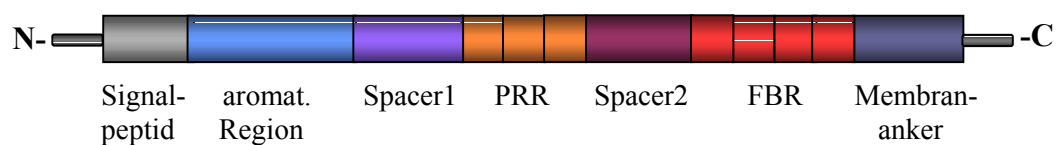
<u>Gene im Vergleich</u>	<u>variabler Genbereich</u>	<u>konservierter Genbereich</u>	<u>gesamtes Gen</u>
<i>gfbI</i> / <i>sfbI</i>	74.5 %	96.8 %	85.8 %
<i>gfbI</i> / <i>gfbA</i>	69.5 %	97.9 %	82.4 %
<i>sfbI</i> / <i>gfbA</i>	70.0 %	97.0 %	83.7 %

### Abb.4: Sequenzhomologien der Gene *gfbI*, *sfbI* und *gfbA*. Werte in %-Homologie.

Die Homologien im konservierten Bereich sind in allen drei Sequenzen sehr hoch (96.8-97.9). Dennoch zeigen sich Unterschiede, das Gen *gfbI* weist zwar im konservierten Bereich marginal höhere Homologien zu dem Gen *gfbA* auf (97.9% vs. 96.8%), im variablen Teil zeigt sich aber eine höhere Homogenität zum *sfbI*-Gen (74.5% vs. 69.5%). Insgesamt kommt es daher zu einer größeren Ähnlichkeit zwischen den Genen *gfbI* und *sfbI* (85.8% vs. 82.4%).

### 3.1.4. Proteinsequenz und Vergleich mit bekannten Proteinen

Die DNA-Sequenz des *gfbI*-Genes (3.1.3. Abb.3) wurde mit Hilfe des Internet-Programmes BCM-Searchlauncher aus der Nukleotid-Sequenz in die Aminosäure-Sequenz übersetzt. Den einzelnen Aminosäuren des GfbI können aufgrund der hohen Sequenzhomologie analog zum SfbI-Protein (Talay *et al.*, 1992) funktionale Domänen zugeordnet werden (s.1.5.). Diese Domänen sind als Funktionseinheiten in **Abb.5** und **Abb.6** dargestellt:



**Abb.5: Funktionale Domänen für das Protein GfbI;** PRR= Prolinreiche Region; FBR = Fibronectin-Bindungs-Region, **Spacer2** = Fibronectin bindender Spacer; **N=** N-Terminus; **C=** C-terminaler Bereich.

Das Protein verfügt wie auch SfbI (Talay *et al.*; 1992) und GfbA (Kline *et al.*, 1996) über 5 Domänen. Diese gliedern sich in ein N-terminales Signalpeptid, welches das Protein durch die Zelle zur Membran dirigiert, in die es dann über den Membrananker integriert bleibt. An diesen Membrananker schließt sich eine Fibronectin bindende Region an (FBR), welche wie beim Protein SfbI (aus A20) aus vier sich wiederholenden Sequenzen (Repeats) besteht, während die FBR des GfbA nur aus drei Repeats besteht (Kline *et al.*, 1996) (s. hierzu auch **Abb.5**). Die Anzahl der Repeats variiert jedoch auch generell zwischen einzelnen Isolaten der Gruppe A Streptokokken. Für das SfbI-Protein wurde durch die Bindung von Fibronectin an diese Region eine Konformationsänderung angenommen, welche zur Exposition des Fibronectin bindenden Spacer2 führt (Talay *et al.*, 2000). Dieser liegt auch im GfbI in unmittelbarer Nachbarschaft zur FBR. An diese Einheit schließt sich eine prolinreiche Region an (PRR), welche im GfbI aus 3 Repeats besteht. Dies entspricht der Anzahl der Repeats im GfbA, wohingegen das Protein SfbI aus A20 über 4 prolinreiche Repeats verfügt (s. hierzu auch **Abb.5**).

Wie die DNA-Sequenzen (s.3.1.3.), so wurden auch die Proteinsequenzen der Proteine GfbI, SfbI und GfbA miteinander verglichen. Ein Alignment mit den Sequenzen des SfbI-Proteins aus *S. pyogenes* (AccNo. X67947) und des GfbA-Proteins aus Gruppe G Streptokokken (AccNo. U31115) nach der MegAlign/Clustal W (Slow/Accurate, IUB)-Methode ergab folgende Homologien.

1	MFLRGEKMNKMFNLKEAGFLAHTKRKRFAVTLVGVFVFMLLACAGAIGFGQVAYAADEKTVPNLSSPNPEFPWYGYDAY	GfbI_Protein
1	MFLRGEKMNKMFNLKEAGFW-HTKRKRFAVTLVGVFVFMLLACAGAIGFGQVAYAADEKTVPNFKSPDPDYFPWYGYDAY	GfbA_Protein
1	MFVRGEKMNKMFNLKEAGFLAHTKRKRFAVTLVGVFVFMLLASAGAIGFGQVAYAADEKTVPHRVSONPEFPWYGYDFY	SfbI_Protein
81	GKGYPGYDISKYHYDLRVNVLKSGSKEYQVYCFNLNKSFFPYRVNSSVKKWYKRLGTAEVFKVHADGSR-----VGGEEL	GfbI_Protein
80	TGAFILR-----YHDLNVNLEGSTPYQVYCFNLVROEPSKVNNGFRKFRFKVVDGDNVAFKQYANPR-----VIDGDL	GfbA_Protein
81	KGPYTR-----YHNLQNLNGSKTYQAYCFNLKRFEPPKESYFNPWYKRWGSEETFKVYADNPRKDNESSRVIDVEL	SfbI_Protein
154	TKKLRSVMYNGYPNDGNNIMKDLEPLNAIEVTQHAWWYSDNS-HYQIETXWSEAKKGEISREQVNLMRKALKKLIDPE	GfbI_Protein
147	ERNILNVIYNGYPSDANGIMKGLDRYNAILVTQTAIWYSDNS-KEIVDEQWKSELRDGEISESQVKLMRDALRKLI SPD	GfbA_Protein
155	EKNILRVLYNGYPNNGNGIMEGLEPLNAILVTQNAVWYSDNSSIENTDNFFTTEAKDLNIKPEQLSLMRVALKKLIDPK	SfbI_Protein
233	LEQKVPN----DYQLNIFESLDSTYQHLLSAEFVPNNPPKTGETP-----EYGPKTPELDGSPIDEDPKHPDENSEPTL	GfbI_Protein
226	LEKTVKNQLPENYKLNLFISKDNSIQNLLSTEVQDNLQKPGEPEKESPEENPKIPDLGHEIPEVPQEP---SDPVI	GfbA_Protein
235	LSEESLKPVEFTFRNLNIFESQDKLYQNLLSAEFVPNNPPKPGETP-----EHGPKTPELDGTPIPEGQRPNESLEPTL	SfbI_Protein
303	PPVMLDGEEVPEVPSESELEPALPPLMPELDGO-----EVPEKPSVDLPPIEVPRYEFNNKDQ	GfbI_Protein
303	PPVILDGEEVPEVPSESELEPALPPLMPELDGO-----EVPEKPSIDLPIEVPRYEFNNKDQ	GfbA_Protein
309	PPVMLDGQEVPEVPSESELEPALPPLMPELDGOEVPEVPSESELEPALPPLMPELDGOEVPEKPSVDLPPIEDPRYEFNNKDQ	SfbI_Protein
359	SPLAGESGETEYITEVYGNQONPVDIDKKLPNETGFGSGNMVETEDTNEPEVLMGGQSESVFETEDTQTMMSGQTTPQVET	GfbI_Protein
359	SPLAGESGETEYITEVYGNQONPVDIDKKLPNETGFGSGNMVETEDTKEPEVLMGGQSESVFETKDTQTMMSGQTTPQVET	GfbA_Protein
389	SPLAGESGETEYITEVYGNQONPVDIDKKLPNETGFGSGNMVETEDTKEPGVLMGGQSESVFETKDTQTMMSGQTTPQVET	SfbI_Protein
439	EDTKGPEVLMGGQSESVFETKDTQTMMSGQTAFQVETEDTKEPGVLMGGQSESVFETKDTQTMMSGQTTPQVETEDTKEP	GfbI_Protein
439	EDTK-----EPGVLMMGGQSESVFETKDTQTMMSGQTTPQVETEDTKEP	GfbA_Protein
469	EDTKEPGVLMGGQSESVFETKDTQTMMSGQTASQVETEDTKEPGVLMGGQSESVFETKDTQTMMSGQTTPQVETEDTKEP	SfbI_Protein
519	GVLMMGGQSESVFETKDTQTMMSGFSETMTVVEDTRPKLVFHFDDNNEPKVEENREKPTKNITPILPATGDIENVLAFLGIL	GfbI_Protein
482	GVLMMGGQSESVGFTKDTQTMMSGFSETATVVEDTRPKLVFHFDDNNEPKVEENREKPTKNITPILPATGDIENVLAFLGIL	GfbA_Protein
549	GVLMMGGQSESVFETKDTQTMMSGFSETVTIIVEDTRPKLVFHFDDNNEPKVEENREKPTKNITPILPATGDIENVLAFLGIL	SfbI_Protein
599	ILSVLPPIFSLKKNQNNKV	GfbI_Protein
562	ILSVLPPIFSLKKNQNNKV	GfbA_Protein
603	ILSVLPPIFSLKKQTKQSL	SfbI_Protein

**Abb.6: Alignment-Bericht der Aminosäure-Sequenzen von GfbI, SfbI und GfbA.**  
 Homologe Bereiche sind gelb unterlegt. **rot** = Prolin-Repeats; **grün** = Fibronectin bindende Repeats; **blau** = Membrananker

### Homologien der Protein-Sequenzen in %

Auch die Sequenzen der drei verschiedenen Proteine wurden für eine exaktere Analyse in variable und konservierte Regionen unterteilt und unabhängig voneinander im Programm Citrix/MegAlign ein Alignment durchgeführt. Dabei umfasste der variable Bereich für GfbI die Aminosäuren 1-313, die Aminosäuren 314-618 lagen im konservierten Bereich. Folgende Angaben sind in % Homologie dargestellt.

<u>Proteine im Vergleich</u>	<u>variabler Proteinbereich</u>	<u>konservierter Proteinbereich</u>	<u>gesamtes Protein</u>
GfbI / SfbI	66.6 %	93.3 %	80.9 %
GfbI / GfbA	58.6 %	97.5 %	77.4 %
SfbI / GfbA	59.3 %	93.2 %	76.0 %

**Abb.7: Sequenzhomologien der Proteine GfbI, SfbI, GfbA.** Werte in %-Homologie.



Auch hier zeigt sich eine höhere Homologie des GfbI zum SfbI im variablen Bereich des Proteins (66.6% vs. 58.6%), während im konservierten Bereich die Ähnlichkeit zum GfbA größer ist (97.5% vs. 93.3). Dennoch ist über das Gesamtprotein die Homologie zwischen SfbI und GfbI eindeutiger (80.9% vs. 77.4%).

### **3.2. Charakterisierung des Fibronektin bindenden Proteins GfbI**

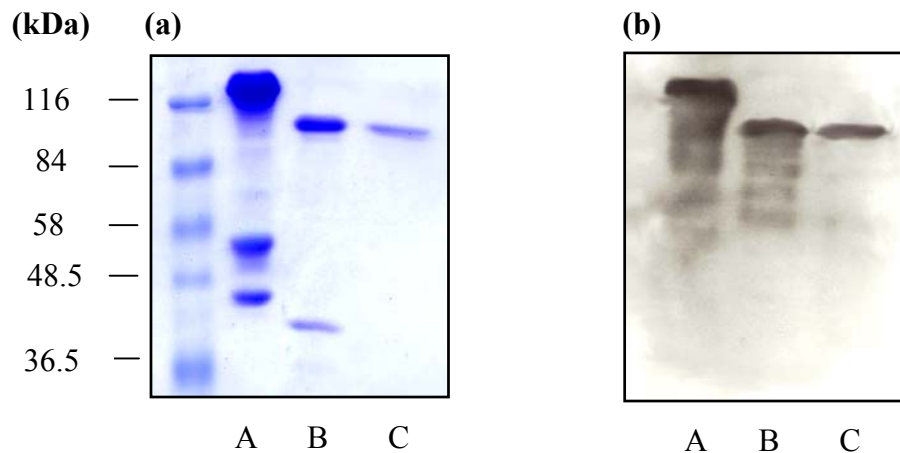
#### **3.2.1. Klonierung, Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins**

Um die Funktion des vom Gen *gfbI* codierten Proteins zu untersuchen, wurde dieses kloniert, exprimiert und aufgereinigt (s.3.2.1.).

Das Gen *gfbI* wurde mit den Primern SF1/SR1 aus der chromosomalen DNA des Isolates G59 amplifiziert. Über die bei der PCR entstehenden polyAAAA-Überhänge wurde das Fragment in den Vektor pCR2.1 subkloniert (TOPO-TA, Invitrogen), welcher überhängende polyTTTT-Enden aufweist. Dies macht die Verwendung von Restriktionsschnittstellen in den Primern und die Verwendung von Restriktionsenzymen überflüssig. Mit diesem Vektor wurden DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert, und der Vektor anschließend aufgereinigt. Aus dem so gewonnenen Vektor wurde das codierende DNA-Fragment mit den Primern PCR1/5'-Sal amplifiziert und unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Sal*I in den Expressionsvektor Vektor pGEX-6P-1 kloniert (s. 2.7.9.1.). Anschließend erfolgte die Aufreinigung als GST-Fusionsprotein und für weitere Untersuchungen die Abspaltung des GST-Tags (s. 2.8.1.-2.8.3.; 2.8.6. und als Ergebnis siehe 3.2.2./Abb.8).

### 3.2.2. GfbI ist ein Fibronektin bindendes Protein

Zur Kontrolle der Funktion und des Erhaltes der Fibronektinbindungs-Aktivität des rekombinanten Proteins wurde ein Overlay-Blot durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Inkubation mit dem 70 kDa-Fragment des Fibronektins und einem Alkalische-Phosphatase-gekoppeltem anti-Fibronektin Zweitantikörper (antiFn-AP; s.2.8.2.2.).



**Abb.8: Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit Funktionsanalyse. Bahn A =** aufgereinigtes rekombinantes Protein; **Bahn B** = Protein nach PreScission-Protease-Verdau; **Bahn C** = nach Entfernen des abgespaltenen GST-tags. **(a)** Überprüfung der Aufreinigung des rekombinanten Proteins in einem 10%-igem SDS-Gel unter Verwendung des SDS-7b-Markers (Sigma; Angaben in kDa) und einer Coomassie-Färbung. **(b)** Kontrolle des Funktionserhaltes des rekombinanten Proteins GfbI im Fibronektin-Overlay- Blot.

Die Größe des gereinigten Proteins beträgt ca. 120 kDa (Bahn A), und entspricht der Laufhöhe des homologen, rekombinanten SfbI Proteins. Die Laufhöhe ist im weiteren Verlauf (Bahn B und C) durch die Abspaltung des GST-tags reduziert. Das GST-tag konnte vollständig aus dem Versuchsansatz entfernt werden (Bahn C) und das erhaltene rekombinante Protein (b/Bahn C) ist in der Lage, Fibronektin zu binden. Damit wurde GfbI als funktionsfähiges, rekombinantes Protein gewonnen.

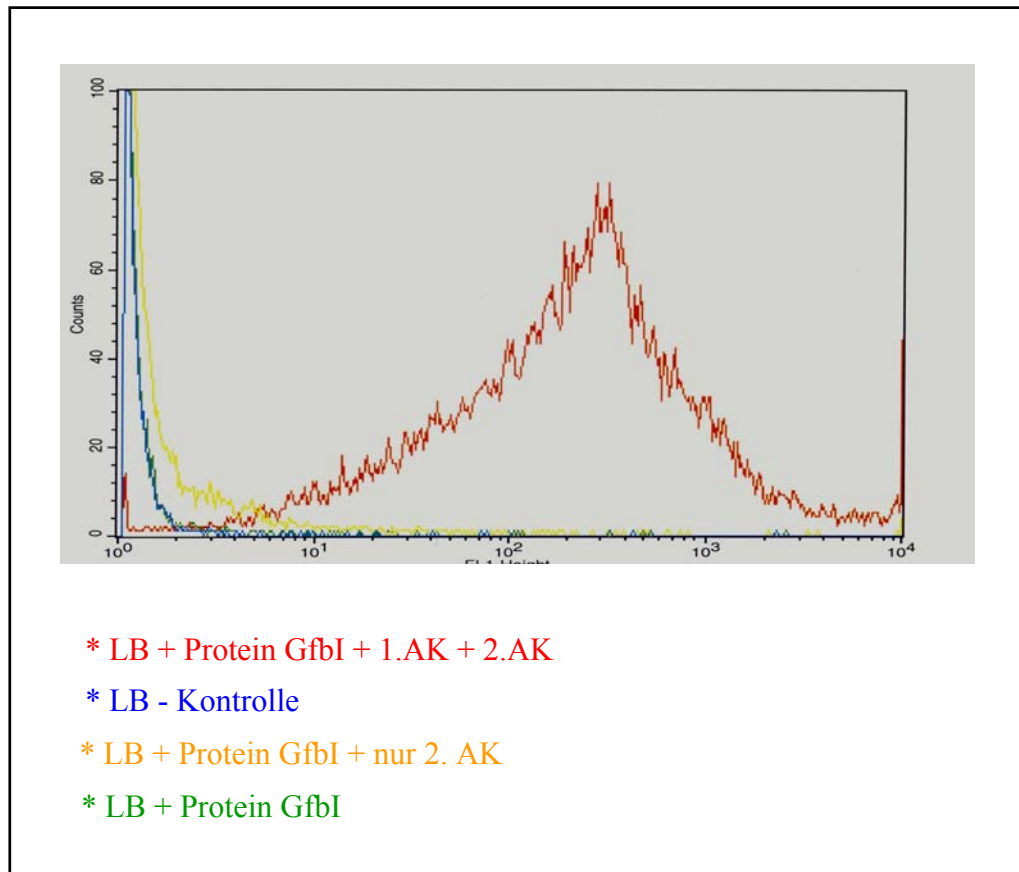
#### 3.2.2.1. Rekombinantes GfbI vermittelt Adhäsion an und Invasion in humane Epithelzellen

#### 3.2.2.2. Kopplung des rekombinanten Proteins an Latex Beads

Für die Untersuchungen des rekombinanten Proteins in der Zellkultur wurde das rekombinante Protein ohne GST-tag (2.8.3.) an Latex Beads gekoppelt (2.8.8.). Durch die Verwendung inerter Beads als Träger ist es somit möglich, das isolierte Protein

unabhängig von Wechselwirkungen mit weiteren bakteriellen Oberflächenproteinen zu untersuchen.

Die Kopplung wurde mittels eines spezifischen Antikörpers gegen das gekoppelte Protein (2.8.8.) und eines fluoreszenzmarkierten (FITC) Zweitantikörpers in der Durchflußcytometrie (FACS) nachgewiesen. Als Kontrollen dienten unbehandelte Latex Beads, Latex Beads mit gekoppeltem Protein ohne Antikörperinkubation und Latex Beads plus Protein, welche nur mit dem Zweitantikörper inkubiert worden waren.

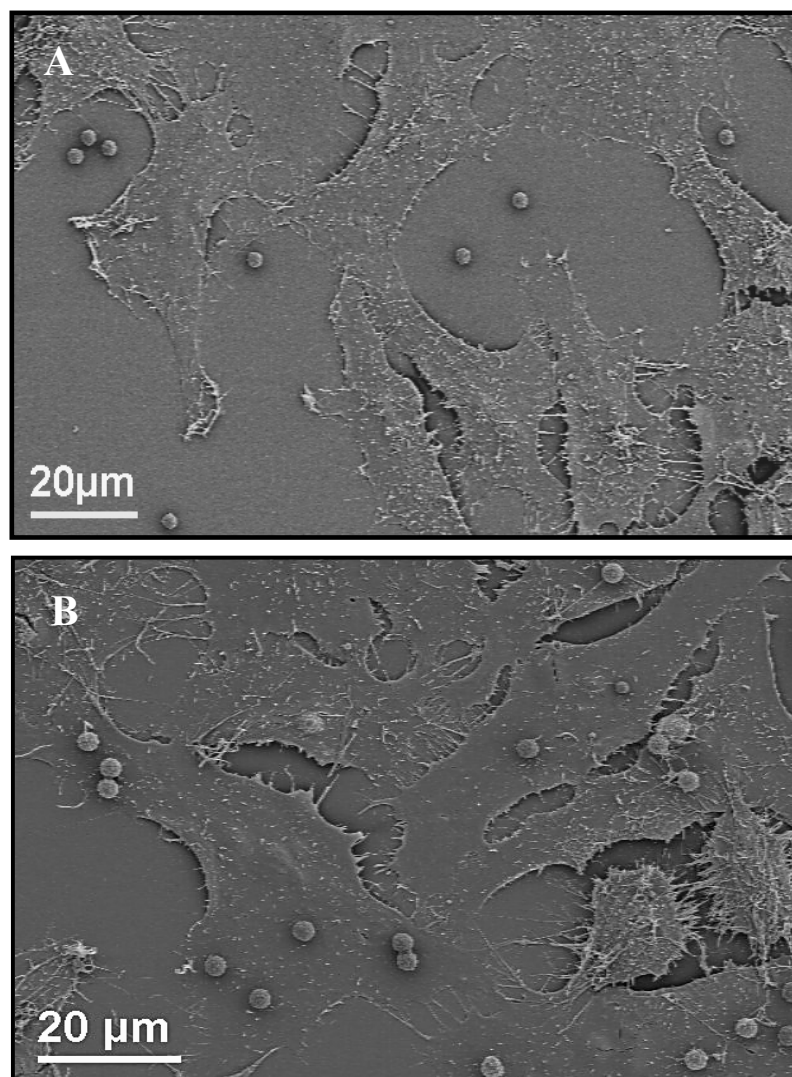


**Abb.9: FACS-Analyse zur Überprüfung der vollständigen Kopplung des rekombinanten Proteins GfbI an Latex Beads.** LB = Latex Beads; 1.AK = erster Antikörper antiGfbI; 2.AK = Zweitantikörper Ziege-anti-Kaninchen FITC gekoppelt.

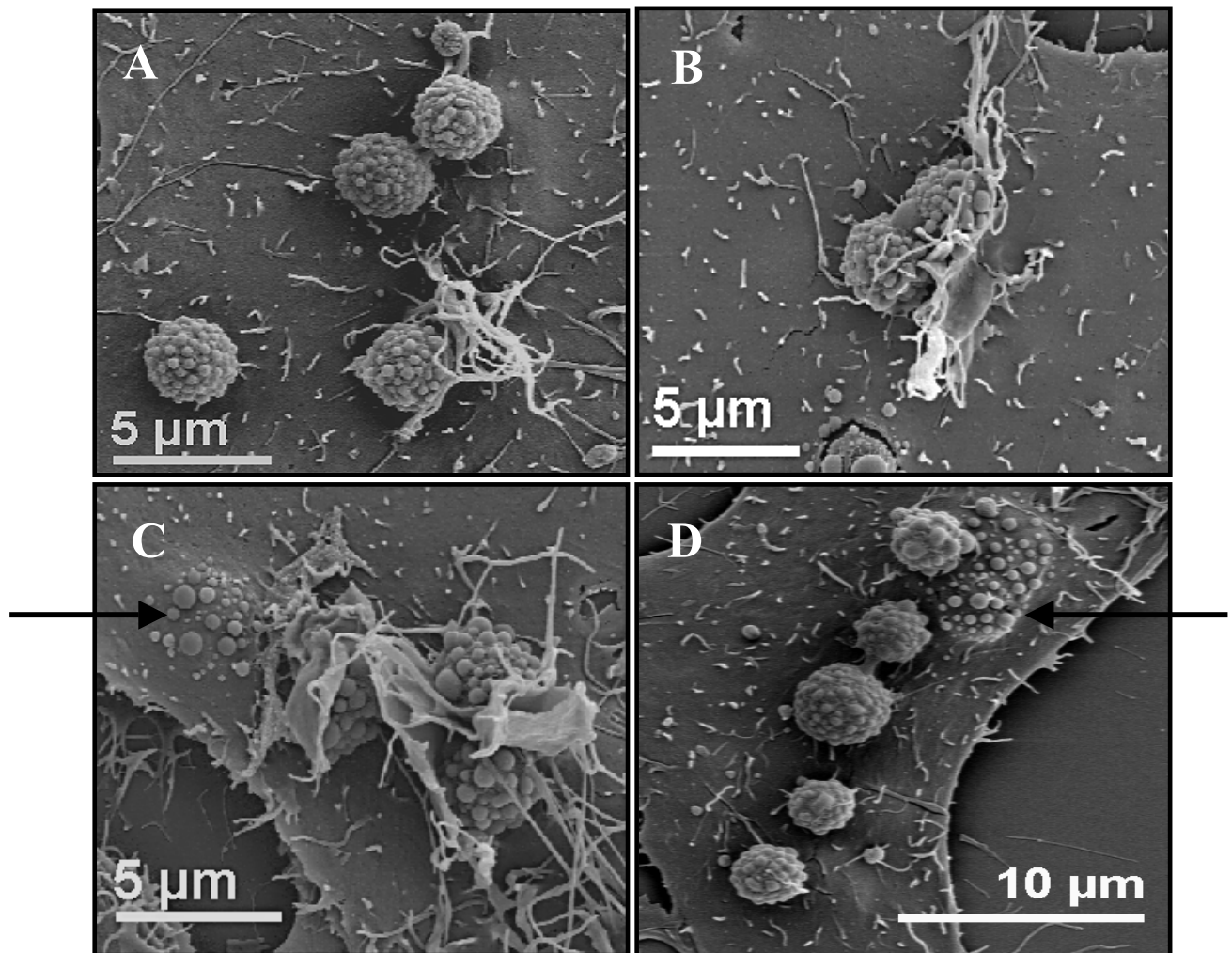
Latex Beads mit gekoppeltem Protein ohne Antikörperinkubation (grün) sowie nur Latex Beads (blau) bilden die Nulllinie und zeigten keine Fluoreszenz. Latex Beads, welche mit dem rekombinanten Protein gekoppelt und ausschließlich mit dem 2. Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen FITC gekoppelt) inkubiert wurden, zeigten eine schwache Detektion. Der 2. Antikörper wurde auf niedrigem Niveau unspezifisch gebunden. Latex Beads mit gekoppeltem Protein und Inkubation mit einem spezifischen anti-GfbI-AK und dem 2. Antikörper zeigten einen deutlichen Peak (rot). Dies deutet auf eine erfolgreiche Kopplung hin und zeigt, dass sich das rekombinante Protein auf der Oberfläche der Latex Beads befindet.

### 3.2.2.3. Infektion von humanen Epithelzellen mit GfbI-gekoppelten Latex Beads (REM und DIF-Analysen)

In diesem Versuch wurden die biologische Relevanz des Fibronektin bindenden Proteins GfbI auf Adhäsion und Invasion an humane Epithelzellen analysiert. Desweiteren wurden die morphologischen Besonderheiten mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht (Abb.10 und 11). HEp-2-Zellen wurden mit Latex Beads für 2h (Abb.10/A und B), für 1h (Abb.11/ A, B) und für 3h (Abb.11/ C, D) inkubiert (2.9.1.). Es wurden sowohl Latex Beads ohne rekombinantes Protein, als auch Latex Beads mit gekoppeltem Protein (3.2.4.1.) verwendet. Unbehandelte Latex Beads adhärieren nicht an HEp-2-Zellen.



**Abb.10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Latex Beads im Infektionsversuch an HEp-2-Zellen (nach 2h).** (A) Latex Beads ohne Protein sind nicht adhären. (B) Latex Beads mit rekombinantem Protein GfbI gekoppelt adhäreren deutlich an die HEp-2- Zellen.

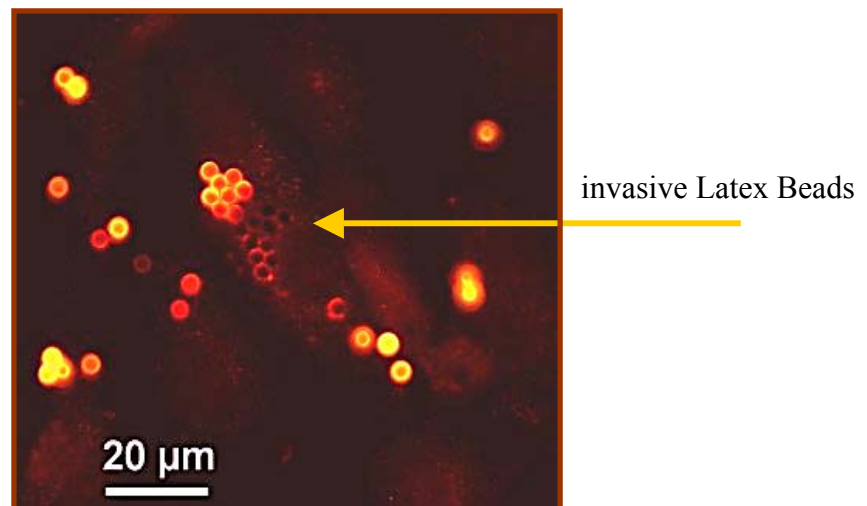


**Abb.11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Latex Beads im Infektionsversuch mit HEp-2-Zellen.** A und B = Aufnahmen nach 1 h, Latex Beads mit rekombinantem Protein rufen auf den HEp-2-Zellen Membranausstülpungen hervor. C und D = Aufnahmen nach 3 h, die Membranausstülpungen führen im weiteren Verlauf zu einer Umschließung und zur Aufnahme (Pfeile) der Beads in die Zelle (C und D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass allein das Fibronektin bindende Protein der Gruppe G Streptokokken (GfbI) ausreicht, um die Adhäsion an HEp-2-Zellen zu vermitteln. Dabei kommt es im Verlauf der Inkubation zu einer Reaktion der Epithelzellmembran. Diese Reaktion bewirkt Membranausstülpungen, welche sowohl als gerichtete Filopodien (A), als auch in Form von Membranfalten (B) in Erscheinung treten. Diese Membranfalten sind in der Lage, die Latex Beads zu umschließen, was zu einer vollständigen Aufnahme der Latex Beads in das Zellinnere führt (C und D). Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass das Protein über die Adhäsionsfunktion hinaus zusätzlich die Aufnahme in die Zellen bewirkt - und somit ein wichtiges Invasin der GGS darstellt. Den Beweis der Invasivität lieferte eine Doppelimmunfluoreszenz-analyse (Abb.13).

**Nachweis der Invasivität von GfbI-gekoppelten Latex Beads (DIF-Analyse)**

Im folgenden Versuch sollte der Nachweis erbracht werden, dass die Latex Beads intrazellulär vorliegen. Dazu wurden HEp-2-Zellen 3h mit Protein-gekoppelten Latex Beads inkubiert, fixiert (2.9.1.) und anschließend eine Antikörper-Inkubation durchgeführt (2.11.1). Zunächst wurden die extrazellulären, adhärennten Latex Beads durch den anti-GfbI-Antikörper detektiert und durch einen zweiten Ziege-anti-Kaninchen (Alexa488) grün gefärbt. Nach anschließender Permeabilisierung der Zellen mit TritonX-100 erfolgte die Detektion der intrazellulären Latex Beads mit Hilfe des spezifischen anti-GfbI-Antikörpers und eines Alexa-595 (rot) gelabelten Sekundär-Antikörpers. Durch die Überlagerung des grünen und des roten Farbstoffes auf den extrazellulären, doppelt gefärbten Beads kommt es zu der gelben Farbe.



**Abb.12: HEp-2- Zellen im Invasionsversuch (3h) mit rekombinantem Protein GfbI gekoppelt an Latex Beads.** Adhärennte Beads (gelb) und invasive, intrazelluläre Beads (rot).

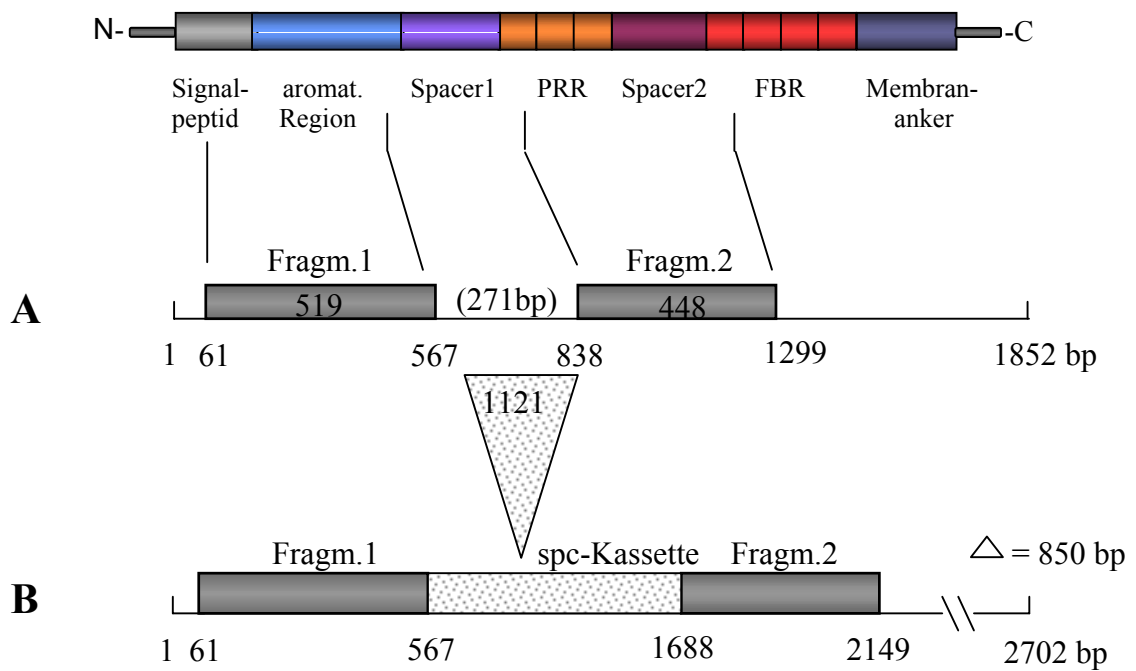
Man erkennt deutlich die extrazellulären, adhärennten Latex Beads (gelb), sowie die ins Zellinnere aufgenommenen Beads (rot). Auch dieser Versuch erbrachte den Nachweis, dass GfbI alleine ausreichend ist, um die Invasion der Beads in die Zellen zu bewirken.

### 3.3. Generierung einer knock-out-Mutante

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung des Proteins GfbI wurde im folgenden eine knock-out-Mutante hergestellt. Eine Insertion in das Gen *gfbI* sollte zu einer Unterbrechung der Transkription führen, und somit die Expression des Proteins auf der Bakterienoberfläche verhindern. Es wurde ein Insertionskonstrukt generiert, welches durch homologe Rekombination in das Chromosom des G59-Isolates integrieren und somit die Transkription unterbrechen sollte.

#### 3.3.1. Generierung des Insertionskonstruktes

Für die Unterbrechung des *gfbI*-Genes im Chromosom des G59-Isolates wurde ein Konstrukt generiert, das zwei homologe Genfragmente des Zielgenes enthält (Fragm1 und Fragm2), welche eine Spectinomycin-Kassette (*spc*) flankieren. Eine Übersicht über die einzelnen Fragmente und deren Lage im Gen ist unter **Abb.13** dargestellt. Das Fragmente 1S (Fragm1+*spec*) wurden mittels Overlap-Extension-PCR gewonnen. Anschließend wurde dieses Fragment (1S) und das ebenfalls durch PCR amplifizierte Fragm2 in den Vektor pCR2.1 kloniert (1S-pCR2.1; Fragm2-pCR2.1). Durch die Restriktionsschnittstellen in den zur Generierung der PCR-Produkte verwendeten Primer (2.4.), konnte ein Restriktionsverdau durchgeführt werden. Mit den Enzymen *AvrII* / *HindIII* wurde der Vektor 1S-pCR2.1 geöffnet, während das Fragm2 aus dem Vektor Fragm2-pCR2.1 gänzlich herausgeschnitten wurde. Eine folgende Ligation ergab ein Fragment 1S2 im Vektor pCR2.1 (1S2- pCR2.1). Eine Umklonierung des Konstruktes 1S2 in den Transformationsvektor pJRS233 erfolgte mit den Enzymen *XhoI* / *PstI*. Eine Übersicht über den Ablauf der Klonierungen ist unter 2.7.8.2./**Abb.2**/Seite34 gegeben.



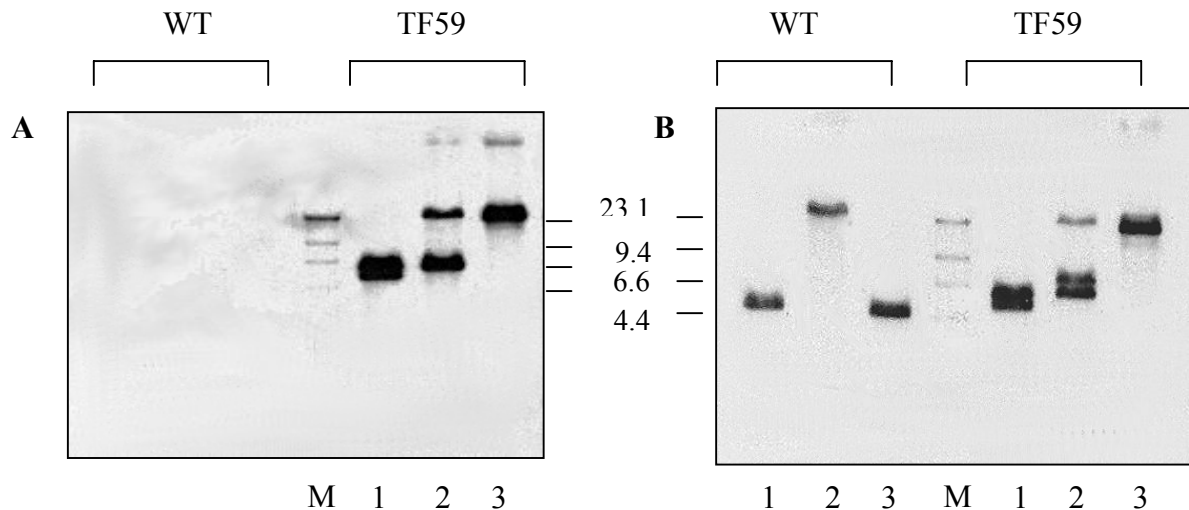
**Abb.13: Angabe der Lokalisation und der Größe der einzelnen Fragmente** zur Generierung des Insertionskonstruktes anhand der Proteindomänen des *gfbI*-codierten Proteins GfbI. Zahlenangaben zur Fragmentgröße in bp. **PRR** = prolinreiche Region; **FBR** = Fibronektin bindende Region; Angabe der Lage und Größe der einzelnen Fragmente im **A** = Gen *gfbI* im Chromosom G59 und **B** = nach Integration des Konstruktes in das Gen *gfbI* im Chromosom, Angaben der resultierenden Endgröße des Gens erfolgt ohne Berücksichtigung des Vektors pJRS233.  $\Delta 850$  bp beträgt somit der Größenunterschied des Gens *gfbI* von Wildtyp zu Mutante nach Insertion.

Dieses Konstrukt wurde anschließend aus dem Vektor 1S2-pCR2.1 in den Zielvektor pJRS233 umklont und ergab das Transformationsplasmid **pJRS233\_***gfbI***::spc**. Während der Elektroporation (s.2.7.10.2.) wurden die Zellen des Wildtyps G59 einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt. Durch diesen entstehen vorübergehend Poren in der Zellmembran, so dass die Fremd-DNA in die Bakterien eindringen kann. Der gewählte Vektor pJRS233 enthält eine Replikationsregion, welche in Streptokokken die autonome Replikation bei 30°C erlaubt. Transformanten wurden aufgrund ihrer Erythromycin-Resistenz selektiert. Ein Temperaturwechsel auf 37°C bei gleichem Selektionsdruck induziert die Integration des Plasmides in das Chromosom durch homologe Rekombination. Die nach der Transformation erhaltenen Klone wurden wie unter 2.7.10.2 beschrieben selektiv hochgezogen und die chromosomale DNA isoliert (2.7.1./2.7.3.). Die transformierten Klone werden im weiteren Verlauf als TF59 bezeichnet. Zur Überprüfung der korrekten Insertion, der Orientierung im Chromosom und auch, ob ein Einzel-oder Doppelcrossover stattgefunden hat, wurden die Transformanten mittels Southern Blot-Hybridisierung (2.7.6.), PCR (2.7.3.) und Sequenzierung (2.7.11.) analysiert.



### 3.3.2. Überprüfen der Transformanten mittels Southern Blot

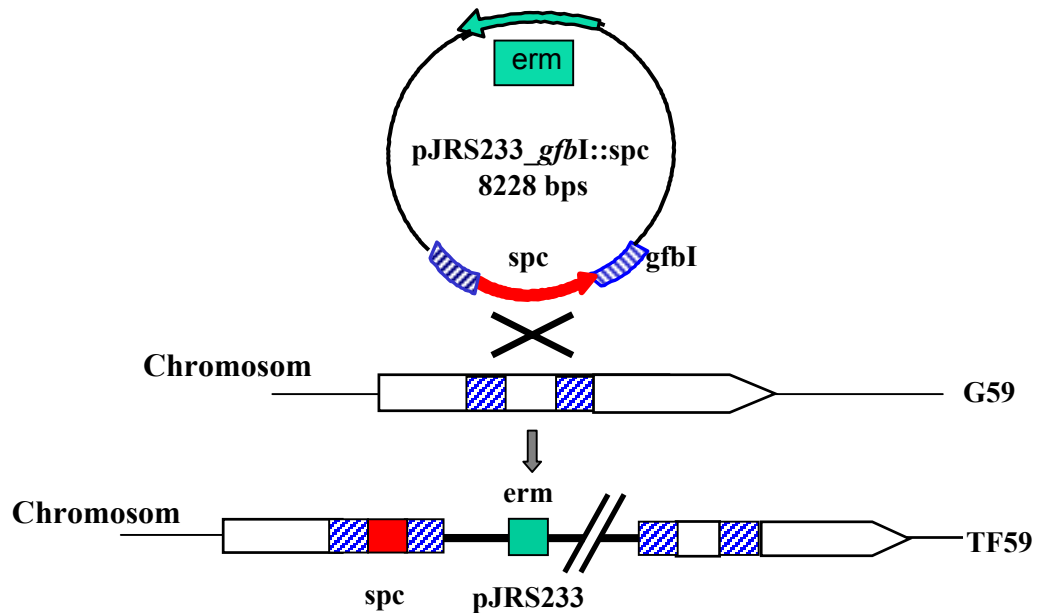
Mittels Southern Blot Analyse sollte sicher gestellt werden, dass das Konstrukt spezifisch und nur an einer Stelle ins Genom integriert wurde. Desweiteren gibt die Analyse der Fragmentgrößen Aufschluß darüber, ob es sich bei der homologen Rekombination um ein Einzel – oder ein Doppelcrossover handelt.



**Abb.15: Southern Blot Hybridisierung** mit einer Sonde **A** = gegen die Spectinomycin-Kassette und **B** = gegen den Genabschnitt *Fragm 2*.; **WT**= Wildtyp G59; **TF59**= Mutante; **Bahn 1**= Doppelverdau chromosomaler DNA mit *EcoRI/HindIII*; **Bahn 2** = Einzelverdau mit *EcoRI*; **Bahn 3** = Einzelverdau mit *HindIII*. Als Marker (**M**) wurde ein  $\lambda$ -*HindIII*-DIG-Marker verwendet, Angaben in kb.

Die Ergebnisse aus Abb.15/Blot A mit der Sonde gegen die Spectinomycin-Kassette zeigen deutlich, dass es bei dem Wildtyp zu keiner Hybridisierung kam, während bei der Mutante die im Konstrukt befindliche *spc*-Kassette detektiert wurde. In Blot B wurde erwartungsgemäß der komplementäre Genabschnitt zur Sonde *Fragm2* sowohl bei dem Wildtyp Isolat G59, als auch bei der Mutante TF59 detektiert. Interessant sind hierbei die Produkte in Blot B/Bahn 3 (*HindIII*-Verdau), die mit einem Größenunterschied von abgeschätzten 10.000 bp ebenfalls beweisen, dass der gesamte Insertionsvektor (8228 bp; pJRS233\_ *gfbI::spc*) in das Chromosom integrierte. Hierbei wird deutlich, dass es sich bei dem Ereignis der Rekombination um ein Einzel-crossover handelt, da der Größenunterschied beim Doppel-crossover bei integriertem Vektor wesentlich größer sein müßte. Das Vorhandensein von nur einer Bande beim *HindIII*-Verdau zeigt ferner, dass der homologe Genabschnitt nur einmal im Chromosom vorkommt. Ein Temperaturshift auf 30°C bei gleichbleibendem Selektionsdruck mit Spectinomycin führten über einen Zeitraum von 8 Wochen leider nicht zu einem gewünschten Verlust des Vektors. Die Mutante war somit nicht stabil, so dass der Selektionsdruck während aller Versuche aufrechterhalten werden musste, damit das Konstrukt im Chromosom verbleibt.

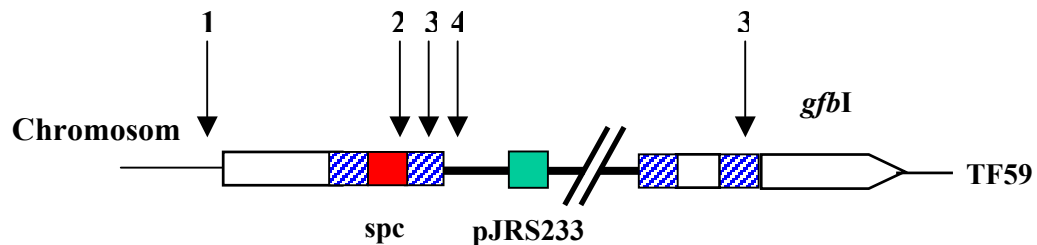
Aus diesen Ergebnissen, ein einzel-crossover in den codierenden Strang des Genes *gfbI*, ergibt sich folgendes Modell zur homologen Rekombination:



**Abb.16: Modell zum theoretischen Ablauf der homologen Rekombination des Insertionskonstruktes pJRS233\_gfbI::spc in das Genom des Isolates G59. Dargestellt als Einzel-crossover mit verbleibendem Vektor pJRS233 in der Mutante TF59.**

### 3.1.1. Überprüfen der Transformanten mittels PCR

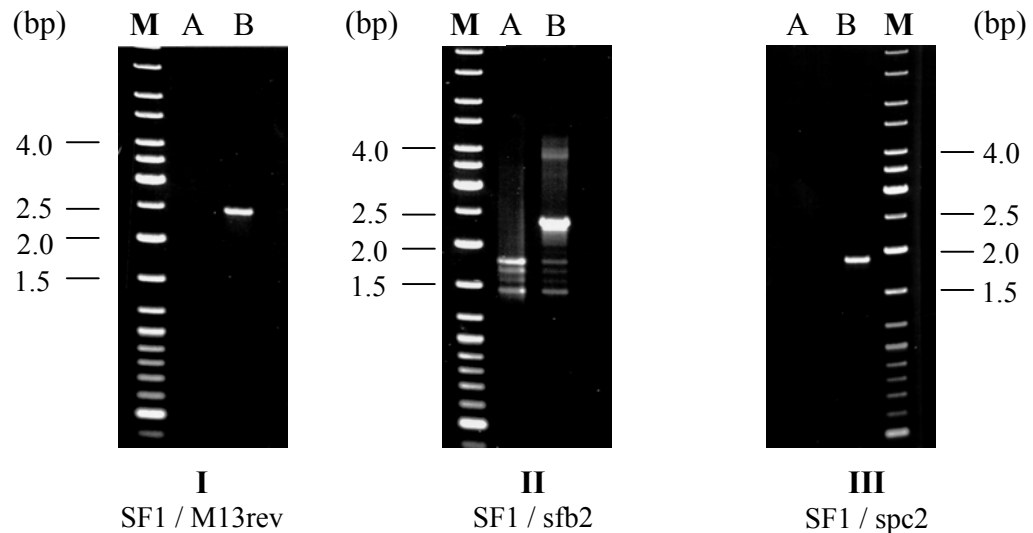
Zur Durchführung der PCR wurde die chromosomale DNA der nach der Transformation erhaltenen Klone durch einen InstaGene-Aufschluß zugänglich gemacht (2.7.3.) und die PCR-Reaktionen mit verschiedenen Primerpaaren (2.4.) durchgeführt.



**Abb.17: Überblick über die Lage der zur Überprüfung der Transformanten verwendeten Primer. 1= SF1; 2 = spc2; 3 = sfb2; 4 = M13rev.**

Bei einem Einzel-crossover des Konstruktes pJRS233\_ *gfbI*::*spc* in den codierenden Strang des Genes *gfbI* ergeben sich aus den Positionen der Primerpaare heraus die theoretisch zu erwartenden und praktisch erhaltenen Produktgrößen der PCR:

Primerpaar	zu erwartende Fragmentgrößen		erhaltene Fragmentgrößen	
	<u>Wildtyp G59</u>	<u>Mutante TF59</u>	<u>Wildtyp G59</u>	<u>Mutante TF59</u>
SF1 / M13rev	--	2486 bp	--	ca. 2490 bp
SF1 / sfb2	1486 bp	2336 bp	ca.1490,1900 bp	ca.2400 bp
SF1 / spc2	--	1888 bp	--	ca.1900 bp



**Abb.18: PCR zur Überprüfung der Klone nach Transformation des Isolates G59 mit dem Insertionskonstrukt pJRS233\_ *gfbI*::*spc*. Bahn A = Wildtyp G59; Bahn B = Mutante TF59, Bahn M = Marker DNA-ladder Mix (Invitrogen). Römisch I-III geben die Primerpaare an, die zur Generierung der Produkte verwendet wurden: **I** = SF1 / M13rev; **II** = SF1 / sfb2; **III** = SF1 / spc2.**

Das Primerpaar SF1 / M13rev (**I**) ergab erwartungsgemäß ausschließlich ein Produkt von 2490 bp aus der chromosomalen DNA der Mutante TF59, da der Primer M13rev. nur im Vektor pJRS233 hybridisiert. Auch der Primer spc2, welcher ausschließlich in der Spectinomycin-Resistenzkassette hybridisiert, ergab nur ein Produkt (ca. 1900 bp) im Ansatz mit der Transformanten-DNA. Dies entspricht der berechneten Fragmentgröße von 1880 bp. Die PCR-Produkte in Abb.18/Bild I und II, Bahn B, sind als klare, einzelne Banden zu erkennen, da die zum Primer komplementäre Sequenz nur einmal vorkommt. Anders in Bild II, auf dem pro Bahn deutlich mehrere Banden zu erkennen sind. Die Ursache liegt darin, dass der Primer sfb2 in der Fibronectin bindenden Region hybridisiert und diese aus 4 Repeats besteht. Die Sequenzen der 4 Repeats in dieser Region sind nahezu identisch und jeweils ca. 100 bp groß (s.3.1.4./Abb6.). Dies erklärt den Größenunterschied von ca. 100 bp und das Vorhandensein mehrerer einzelner Banden. Das Produkt in Bild II/Bahn B (TF59) ist mit ca. 2400 bp um 910 bp größer, als das auf 1490 bp geschätzte Produkt beim Wildtyp (Bild II/Bahn A). Dies entspricht in etwa dem berechneten Unterschied von 850 bp zwischen Wildtyp und Mutante (s.Abb.12).

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass der gesamte Vektor pJRS233\_ *gfbI*::*spc* mit dem Konstrukt wie in Abb.14 gezeigt, in das Gen *gfbI* integriert hat. Durch die erfolgreiche Selektion und Kultivierung der Mutante TF59 mit dem Antibiotikum Spectinomycin ist des weiteren sichergestellt, dass das Konstrukt in frame integrierte und die *spc*-Kassette bis zu deren Stop-Codon transkribiert und translatiert wird.

### 3.3.4. Überprüfen der Transformanten mittels Ansequenzieren

Zur Überprüfung der Transformanten wurde aus der chromosomale DNA ein mit dem Primerpaar PCR1/5B generiertes PCR-Produkt sequenziert. Verwendet wurden zur Sequenzierung ebenfalls die Primer PCR1 und 5B. Aufschluß gab hier vor allem der reverse Primer 5B, welcher im Fragm2 hybridisiert. Die Sequenzreaktionen mit diesem Primer ergaben eine Sequenzlänge von 350 bp.

```

855 GGACACGGGTAAAATCATACCAAAGATATTGCGGGAAATGCAGTGGCTGAATCTTCTCCATTAGAACATAGGGAGAGAA spc
1441 GGACACGGGTAAAATCATACCAAAGATATTGCGGGAAATGCAGTGGCTGAATCTTCTCCATTAGAACATAGGGAGAGAA TF59+1S2
3 ----- TF59rev

935 TTTTGTTAGCAGTTCGTAGTTATCTTGGAGAGAATATTGAATGGACTAATGAAATGTAAATTTAACTATAAACTATTTA spc
1521 TTTTGTTAGCAGTTCGTAGTTATCTTGGAGAGAATATTGAATGGACTAATGAAATGTAAATTTAACTATAAACTATTTA TF59+1S2
3 ----- TF59rev

1015 AATAACAGATTAAAAAATTATAAAAAAATTGAAAAAATGGTGGAAACACTTTTTTCAATTTTTTGTGTTTATTATTAA spc
1601 AATAACAGATTAAAAAATTATAAAAAAATTGAAAAAATGGTGGAAACACTTTTTTCAATTTTTTGTGTTTATTATTAA TF59+1S2
3 -----AACACTTTTGTCAATTTTTTGTGTTTATTATTAA TF59rev

1095 TATTTGGGAAATATTCATTCTAATTG spc
1681 TATTTGGGAAATATTCATTCTAATTGGGCCGCGCTAGCGCGAGTTGGATGGTAGTCCTATTCTGAAGACCCAAAACA TF59+1S2
38 TATTTGGGAAATATTCATTCTAATTGGGCCG-GCCTAGGCGCGAGTTGGATGGTAGTCCTATTCTGAAGACCCAAAACA TF59rev

1120 spc
1761 TCCAGATGAAATTCAGAACCTACATTGCCGCCAGTGATGCTAGATGGTGAAGAAGTCCCAGAAGTTCCAAGCGAGAGCT TF59+1S2
117 TCCAGATGAAATTCAGAACCTACATTGCCGCCAGTGATGCTAGATGGTGAAGAAGTCCCAGAAGTTCCAAGCGAGAGCT TF59rev

1120 spc
1841 TAGAACCTGCGCTTCCTCCATTAATGCCAGAACTAGATGGTCAAGAAGTCCCAGAAAAACCTAGTGTGACTTACCTATT TF59+1S2
197 TAGAACCTGCGCTTCCTCCATTAATGCCAGAACTAGATGGTCAAGAAGTCCCAGAAATAACCTAGTATTGACTTACCTATT TF59rev

1120 spc
1921 GAAGTTCCTCGTTATGAGTTTAAACAATAAAGACCAATCGCCTCTAGCGGGTGAGTCTGGTGAGACGGAGTATATTACCGA TF59+1S2
277 GAAGTTCCTCGTTATGAGTTTAAACAGTAAAG-----CACCAA TF59rev

1120 spc
2001 AGTCTATGGAAATCAACAGAACCTGTTGATATTGATAAAAACTTCCGAATGAAACAGGTTTTTCAGGAAATATGGTTG TF59+1S2
314 A TF59rev

```

**Abb.19: Alignment zur Überprüfung der korrekten Integration des Insertionskonstruktes in das Chromosom der Mutante TF59.** Die erhaltenen Sequenzen (Ausschnitt) aus der Mutante TF59 zeigt Homologien (gelb) im Übergang von der spc-Kassette zum Fragm2 des Konstruktes. **TF59+1S2**= Konstrukt berechnet; **spc** = Sequenz der spc-Kassette; **TF59rev** = durch die Sequenzierung erhaltene Sequenz der chromosomalen Mutanten- DNA mit dem reversen Primer 5B. Alignment der Sequenzen erfolgte nach der Clustal V (Weighted) –Methode.

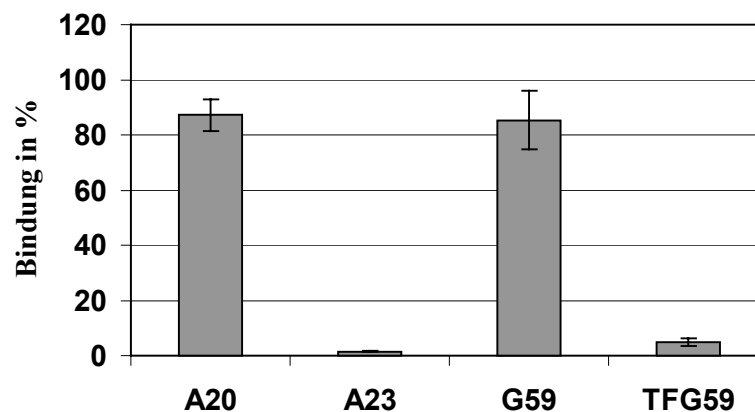
Nach Vergleich der erhaltenen Sequenzen aus der Mutante TF59 (s.2.7.12.) und einem Alignment mit den Sequenzen des Wildtyps zeigte sich, dass die Sequenzen auf der Länge der ersten 1-250bp aus dem *Fragm2* heraus homolog waren, dann jedoch unvermittelt völlig heterogen wurden. Exakt in diesem Bereich erfolgte den theoretischen Konstruktberechnungen zufolge der Übergang des *Fragm2* zur *spc*-Kassette. Ein Alignment der 5B-reverse-Sequenz aus der Mutante mit der Sequenz der Spectinomycin-Resistenzkassette zeigte den gegenteiligen Effekt. In diesem Fall waren die letzten Nukleotide (250-340 bp) der Mutantensequenz homolog zu der Endsequenz der *spc*-Kassette. Daraus folgte das Ergebnis, dass das Konstrukt mit der Resistenzkassette im Chromosom der Mutante an der berechneten Position integrierte, und das Gen *gfbI* in der Mutante TF59 unterbrochen wurde.

### 3.4. Charakterisierung der Adhäsion und Invasion im Vergleich Wildtyp/Mutante

Interessant war die Frage, welche Auswirkungen die Insertion in das Gens *gfbI* in der knock-out-Mutante TF59 auf das Verhalten der Bakterien hat, und ob die homologe Rekombination tatsächlich zum Ausschalten des GfbI Proteins auf der Oberfläche der Bakterien führte. Deshalb wurde durch Bindungsstudien durchgeführt, ob die Mutante noch in der Lage war, Fibronectin zu binden.

#### 3.4.1. Bindungsverhalten gegenüber Fibronectin 70 kDa-Fragment

Die unter 2.10.2 beschriebenen Bindungsversuche mit  $I^{125}$ -markiertem 70kDa-Fragment von Fibronectin wurden mit der Mutante wiederholt. Jeweils im Triplet an drei verschiedenen Tagen.

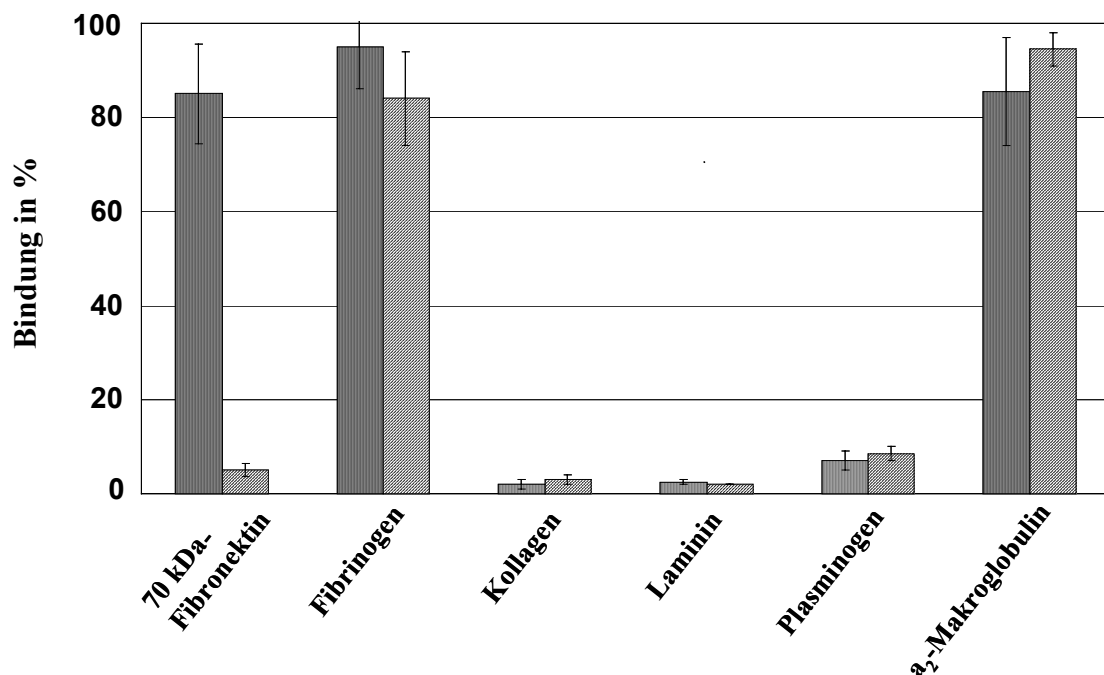


**Abb.20: Bindungsversuch mit  $I^{125}$ -markiertem Fibronectin 70 kDa-Fragment.** A20 = Positivkontrolle; A23 = Negativkontrolle.

Die Bindung von radioaktivem Fibronectin 70 kDa-Fragment beträgt 84% sowohl bei der Positivkontrolle A20 als auch beim Wildtyp G59. Das Isolat A23 verfügt über kein Fibronectin bindendes Protein und kann demnach auch kein Fibronectin binden (Negativkontrolle). Die Mutante zeigte ebenfalls keine Bindung. Dies bedeutet, dass das Protein GfbI zur Fibronectinbindung ausgeschaltet wurde. Desweiteren gibt es keine weiteren Proteine auf der Bakterienoberfläche, die neben GfbI Fibronectin binden könnten. Damit ist GfbI das einzige Fibronectin bindende Protein auf der Oberfläche von Streptokokken der Gruppe G.

### 3.1.1. Bindungsverhalten gegenüber weiteren ECM-Proteinen

Es sollte weiterhin untersucht werden, welchen Einfluß das fehlende GfbI-Protein auf der Oberfläche der Mutante hat und ob das Bindungsverhalten an weitere ECM-Proteine beeinflusst wurde. Verschiedene ECM-Proteine wurden im radioaktiven Bindungsversuch analysiert (2.10.2.). Es wurden Proteine ausgewählt, die bei invasiven Bakterien im Bindegewebe sowohl eine Rolle bei der Adhäsion und Kolonisierung des Wirtes spielen (Kollagen, Laminin), zusätzlich bei der Umgehung der Immunabwehr und der Ausbreitung im Gewebe von Bedeutung sind (Fibrinogen, Plasminogen), als auch in Wunden und im Blut vorkommen (Fibrinogen,  $\alpha_2$ -Makroglobulin).



**Abb. 21: Bindungsversuch mit  $I^{125}$ -markierten ECM-Proteinen.** Vergleich des Bindungspotentials der verschiedenen Proteine von  Wildtyp G59 und  Mutante TF59.

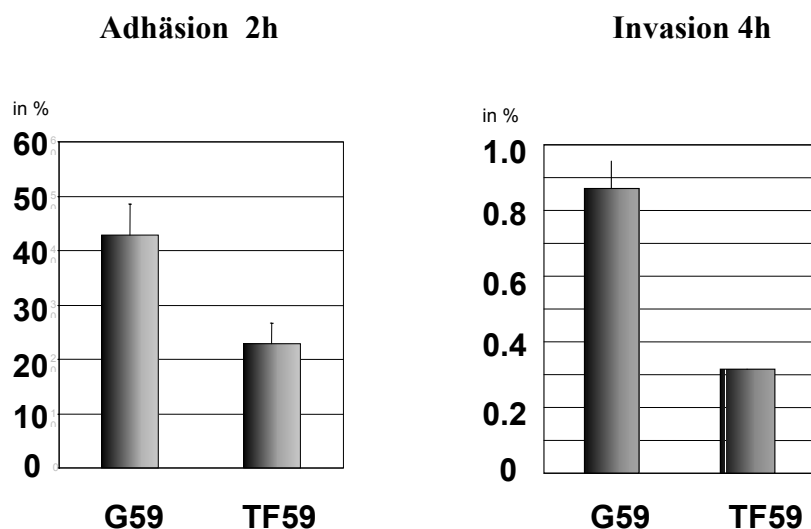
Aus diesen Versuchen ergab sich, dass das Bindungsverhalten bezüglich der ECM-Proteine Kollagen, Laminin, Plasminogen, Fibrinogen und  $\alpha_2$ -Makroglobulin bei der

Mutante im Vergleich zum Wildtyp unbeeinflusst von der genetischen Veränderung bleibt. Alle Proteine wurden im Vergleich Wildtyp/Mutante auf demselben Niveau gebunden. Dies spricht auch dafür, dass GfbI keine Doppelfunktion bezüglich einer zusätzlichen Proteinbindung außer für Fibronectin hat, sondern für die Bindungen weiterer ECM Proteine unabhängige Oberflächenproteine verantwortlich sind.

### 3.1.1. Charakterisierung des Potentials vom Protein GfbI für die Virulenz

Es ist bekannt, dass *S. pyogenes* über eine Fibronectinbindung in der Lage ist, an Epithelzellen zu adhären. Die Fibronectinbindung führt im folgenden Verlauf zu einer Invasion der Bakterien in die Wirtszelle (Talay *et al.*, 1992, 2000; Molinari *et al.*, 1997). Für das Protein GfbA (Kline *et al.*, 1996) wurde nur indirekt über die Fähigkeit, Fibronectin zu binden und durch Inhibierungsstudien vermutet, dass Gruppe G Streptokokken in der Lage sein müssten, an Epithelzellen zu binden. Im folgenden Versuch sollte nun der direkte Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Proteins GfbI und der Fähigkeit zur Adhäsion und Invasion ermittelt werden. Durch den Vergleich mit der knock-out-Mutante sollte die Virulenz und die Bedeutung des GfbI bei diesen Prozessen untersucht werden.

Ein Replattierungsversuch wurde mit humanen Rachenepithelzellen (HEp-2-Zellen) durchgeführt (2.9.3.). Die infizierten HEp-2-Zellen wurden nach 2h (Adhäsion+Invasion) und nach 4h (Invasion) lysiert. Bei dem 4h Wert handelt es sich ausschließlich um intrazellulär überlebende Bakterien, da adhären Streptokokken zuvor durch eine Antibiotika-behandlung abgetötet wurden. Durch Ausplattieren auf THB-Agar wurde die Zahl der überlebenden Bakterien ermittelt und als Kolonie-bildende-Einheiten (CFU) ausgezählt. Das Inoculum wurde (1:1000 und 1:10000 verdünnt) ausplattiert und die Kolonien als Gesamtzahl der eingesetzten Bakterien ausgezählt (100 %-Wert).



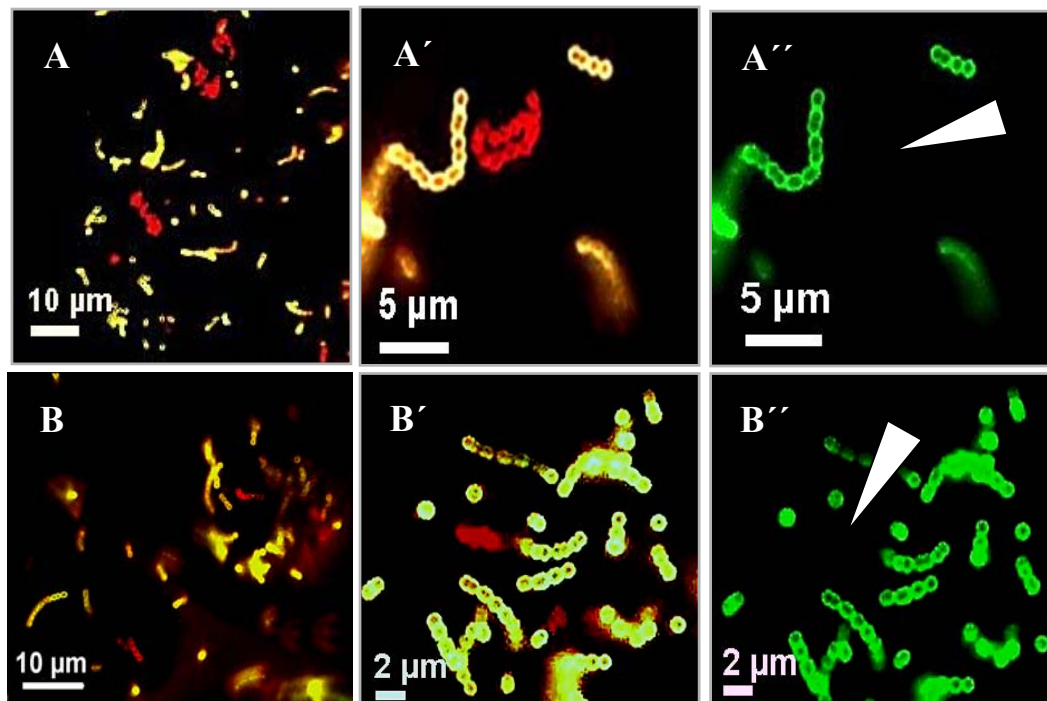
**Abb.22: Replattierungsversuch zur Ermittlung des Potentials vom Protein GfbI für die Virulenz.** CFU im Verhältnis zur Gesamtzahl der eingesetzten Bakterien (100%-Wert) ergibt die Zahl der adhären, bzw. der invasiven Bakterien in %.



Die nach 2h sowohl adhärenenten als auch invasiven Bakterien betrugen beim Wildtyp 43 % der eingesetzten Gesamtmenge. Die Adhäsion der Mutante war deutlich um 50% reduziert. GfbI ist demnach ein wichtiges Adhäsın. Dennoch war die Mutante zu 23 % in der Lage, an die Epithelzellen zu adhäreren. Dies spricht dafür, dass es noch weitere Oberflächenproteine gibt, die neben GfbI für die Adhäsion verantwortlich sind. Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei den Invasionswerten. Hier liegt die Invasionsfähigkeit der Mutante TF59 um 63 % niedriger, als die Rate des Wildtyps. Auch hier zeigte sich der Verlust des GfbI als deutliche Reduktion der Invasionsfähigkeit. Für die verbleibende Invasionsfähigkeit waren auch hier vermutlich andere Faktoren verantwortlich. Die Invasion der Streptokokken in HEp-2-Zellen wurde wie schon im Latex Beads-Versuch (3.2.3.2.) durch Doppelimmunfluoreszenz-Aufnahmen verifiziert, wie sie unter 3.4.4./Abb.23 dargestellt sind. Damit ist erstmalig bewiesen, dass dem Fibronektin bindenden Protein GfbI der Gruppe G Streptokokken auch im physiologischen Umfeld auf der Bakterienoberfläche neben der Funktion als Adhäsın auch eine wichtige Bedeutung als Invasin zukommt. Und es außerdem mindestens einen weiteren, GfbI-unabhängigen Invasionsmechanismus gibt, der zur Virulenz der Bakterien beiträgt.

#### 3.4.4. Invasivität von Wildtyp und Mutante mittels DIF

Für diesen Versuch wurden HEp-2-Zellen mit den Streptokokken-Isolaten G59 und TF59 (Mutante) infiziert (2.9.1.). Anschließend erfolgte eine Antikörperinkubation zur Detektion der Bakterien (2.11.1.). Die adhärenenten Bakterien wurden in einem ersten Inkubationsschritt Alexa488 (grün), die intrazellulären Bakterien im zweiten Inkubationsschritt mit Alexa595 (rot) markiert. Die Antikörper des zweiten Inkubationsschrittes detektierten auch die extrazellulären Bakterien, so dass diese durch die Überlagerung des grünen mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff gelb erscheinen. Die Aufnahmen im Doppelfluoreszenzkanal-Kanal (s. Abb.23/ A, A', B, B') zeigten sowohl extrazelluläre, als auch intrazelluläre Bakterien. Die Aufnahmen im Grünkanal zeigten ausschließlich die extrazellulären Bakterien der Erstdetektion. Dies beweist, dass sich die rot markierten Bakterien im Zellinneren befinden.

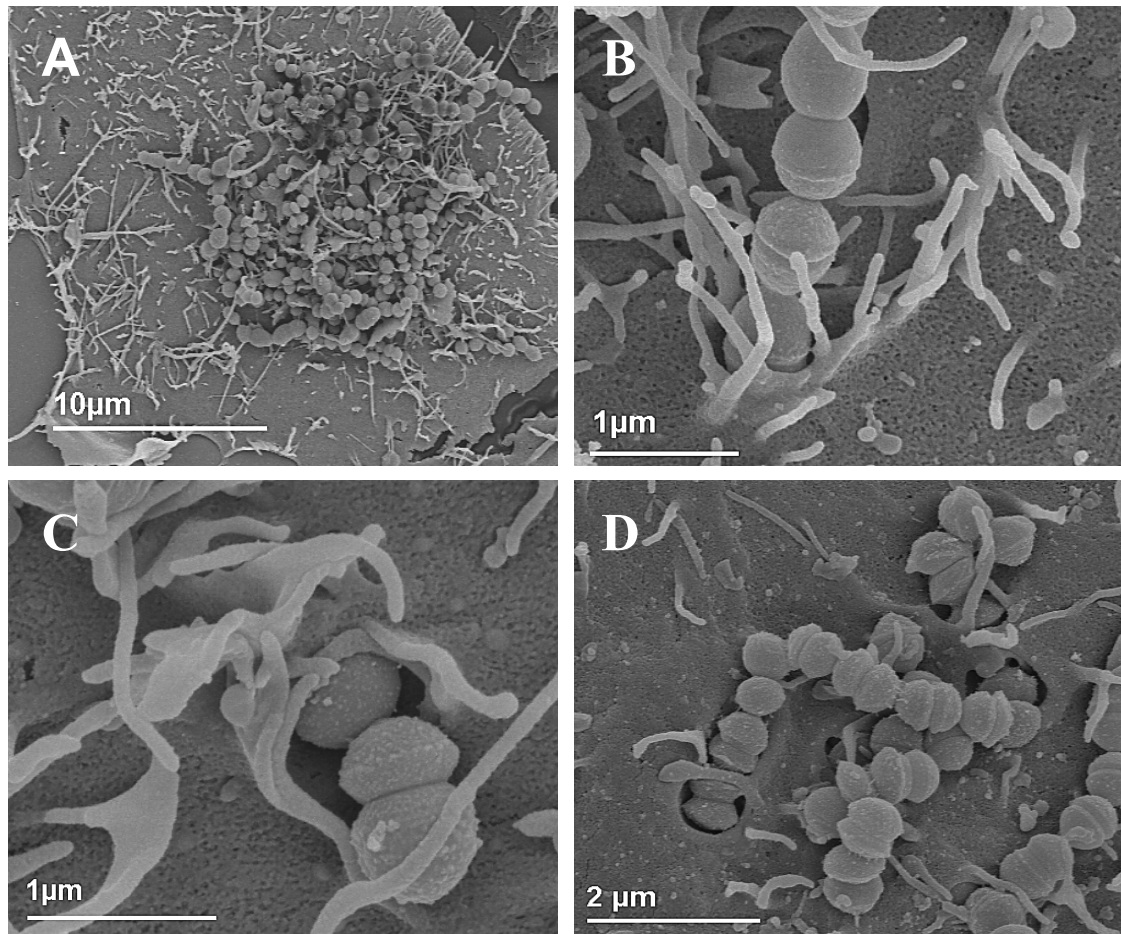


**Abb.23: Doppelimmunfluoreszenz (DIF) zum Nachweis der Invasivität des Wildtyps G59 und der knock-out-Mutante TF59.** A = G59; B = TF59, Extrazelluläre Bakterien sind grün (Alexa488), intrazelluläre Bakterien rot (Alexa595) gefärbt. A, B Überblick der Invasion; A', B' Aufnahmen wurden mit einem Doppelfilter angefertigt und zeigen extrazelluläre und intrazelluläre Bakterien; A'', B'' Aufnahme ausschließlich der grünmarkierten, extrazellulären Bakterien.

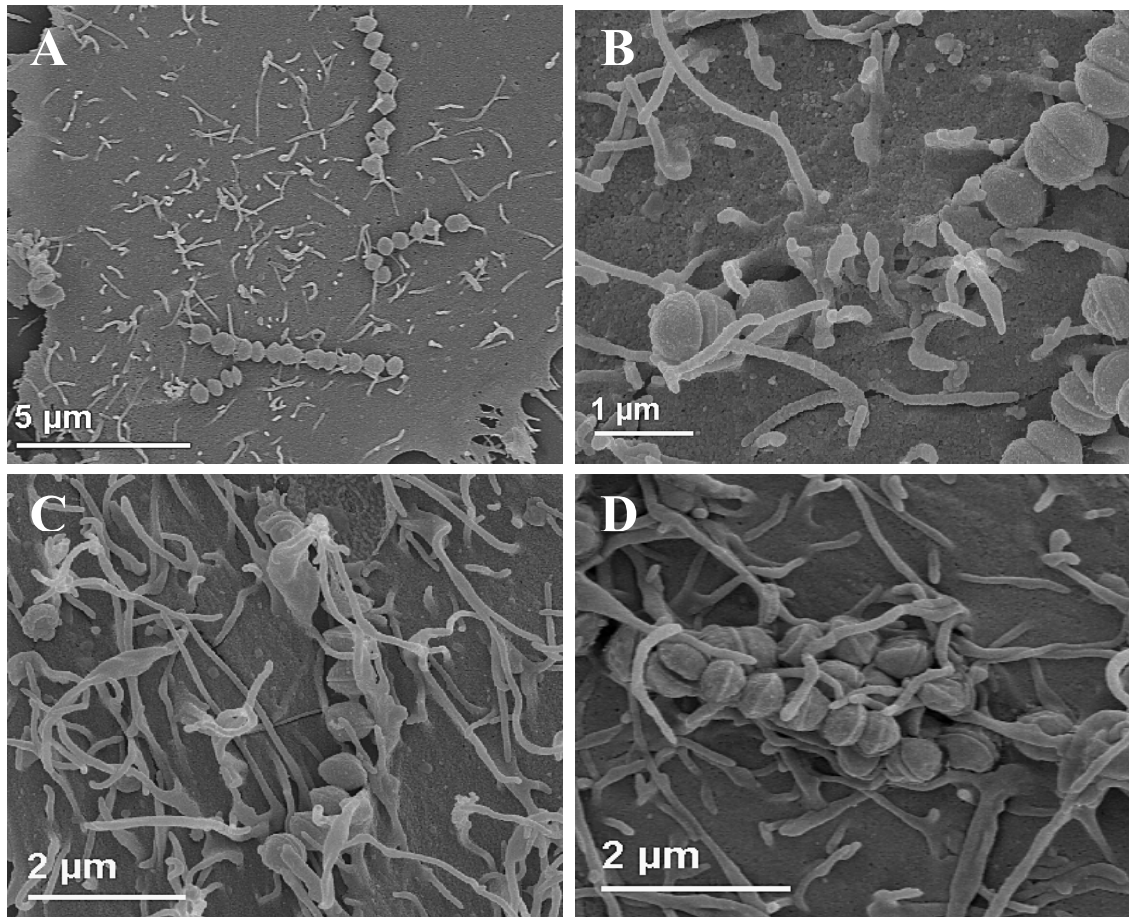
Wie aus dem Replattierungsversuch zu erwarten war, konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Mutante TF59 auch nach Ausschalten des Proteins GfbI in der Lage war, HEp-2-Zellen zu invadieren. Im Vergleich zum Wildtyp G59 war die Adhäsion und Invasion reduziert. Intrazelluläre Bakterien lagen in kürzeren Ketten, bzw. in kleineren Anhäufungen vor.

### 3.1.1. Untersuchungen zur Infektionsmorphologie mittels REM

Wie Kapitel 3.2.3.2./Abb.11 gezeigt hat, bewirkt allein Gfbl eine Reaktion der Epithelzell-Oberfläche und dadurch die Aufnahme der Gfbl-gekoppelten Latex Beads. Dabei kommt es zu Membranausstülpungen und Faltungen. Mit dem folgenden Versuch sollte die Morphologie der Zelle während der Adhäsion und Invasion der Gruppe G Streptokokken (Isolat G59) untersucht werden. Interessant war dies im Hinblick auf die Mutante (TF59), welche Aufschluß über die weiteren, möglichen Invasionswege (3.4.3. und 3.4.4.) und Veränderungen der Wirtszelle geben konnte. Dazu wurden HEp-2-Zellen mit den Bakterien G59 und TF59 infiziert und nach 4h fixiert (2.9.1.). Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie (REM; 2.11.2.).



**Abb.24: REM-Analyse der Zellmorphologie während der Infektion mit Streptokokken Isolat G59.** A = Adhäsion des Isolates G59 in großen Zellhaufen überwiegend in der Mitte der Epithelzelle. B = Beginnende Membranausstülpung in Form von sogenannten „Ruffels“ (Faltungen) an einem Pol der Bakterienkette. C und D = Bakterienkette sinkt längsseitig in die Zellmembran ein (D), zusätzlich erfolgt Zipperartiges Übergreifen der von der HEp-2-Zelle gebildeten Filopodien (C).



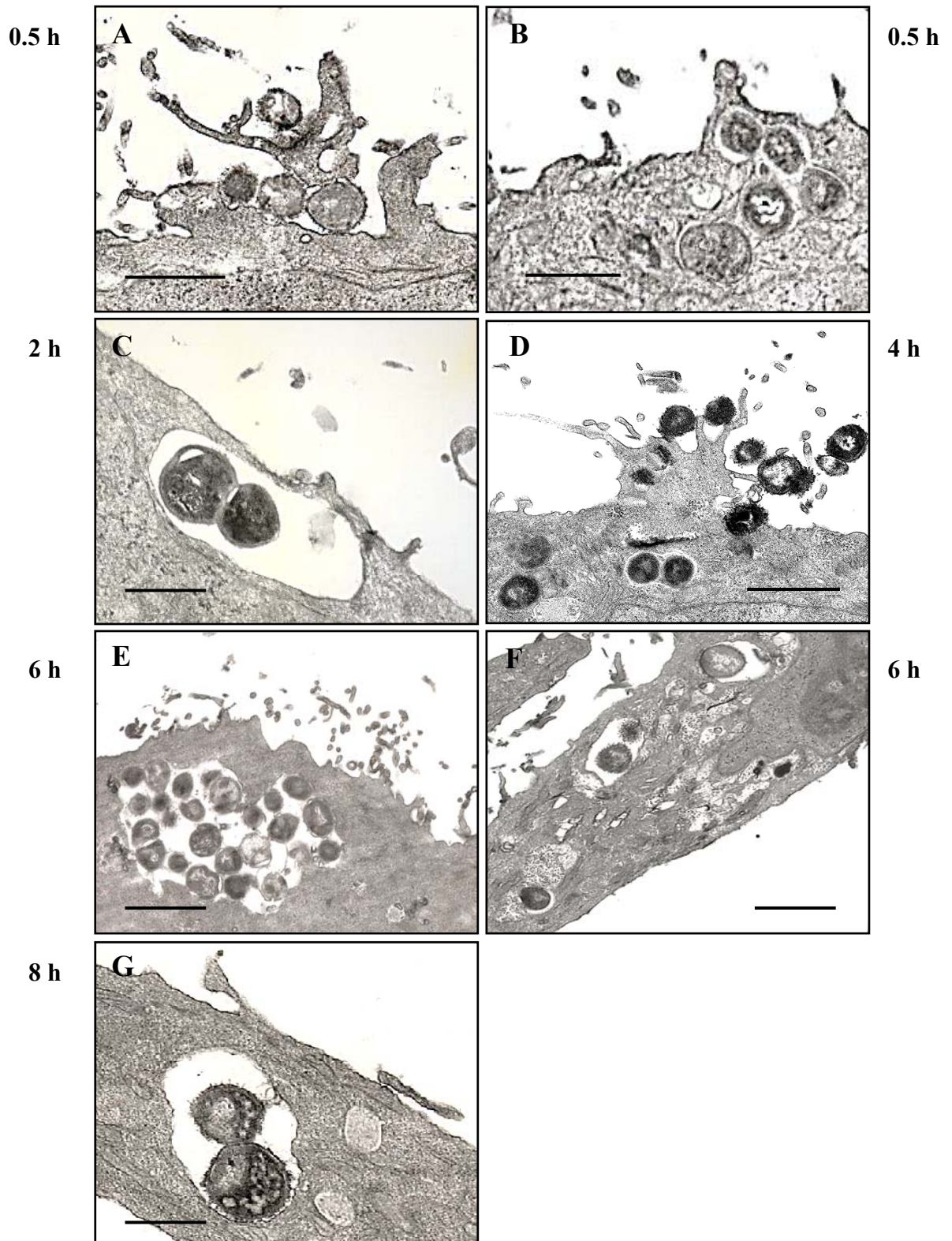
**Abb.25: Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Zellmorphologie während der Infektion von HEp-2-Zellen mit der Mutante TF59. A = Adhäsion der Mutante TF59 erfolgt in kurzen, vereinzelt Ketten über die Epithelzelle verteilt. B = Einsinken der Bakterienkette mit Zipper-artigem Übergreifen der Filopodien. C und D = Seitliches Übergreifen der Filopodien über die Bakterien.**

Für den Wildtyp konnte eine wesentlich stärkere Aggregation der Bakterien als bei der Mutante beobachtet werden. Desweiteren adhärierte G59 stärker in der Zellmitte, während die kürzeren Ketten der Mutante vereinzelt und über die gesamte Breite der Zelle verteilt lagen. Auffällig ist, dass die bei dem Wildtyp G59 beobachteten Membranausstülpungen, die basal zu einer Lamelle verschmolzen waren (Abb.24/B), zu keiner Zeit bei der Mutante beobachtet wurden. Dies lässt sich aufgrund der Ergebnisse des Kapitels 3.2.4.2. auf das Fehlen des Fibronektin bindenden Proteins GfbI zurückführen. Dieser Mechanismus ist ausschließlich an einem Pol der adhärierenden Bakterienkette zu beobachten. Beide, sowohl G59 als auch TF59, zeigten allerdings deutlich einen weiteren Mechanismus. Dieser ist durch eine Art Einsinken der Bakterien gekennzeichnet. Hierbei kommt es ausschließlich längsseits der Ketten zu einem Einwölben der Zellmembran. Zusätzlich greifen die von der Epithelzelle gebildeten Filopodien von beiden Seiten über die Kette der Bakterien, um anschließend in einer Art Reißverschluss zu verschmelzen. Auf diesem Weg gelangten die Bakterien in das Zellinnere (Invasion).

### 3.4.6. Untersuchungen zur Infektionsmorphologie mittels TEM

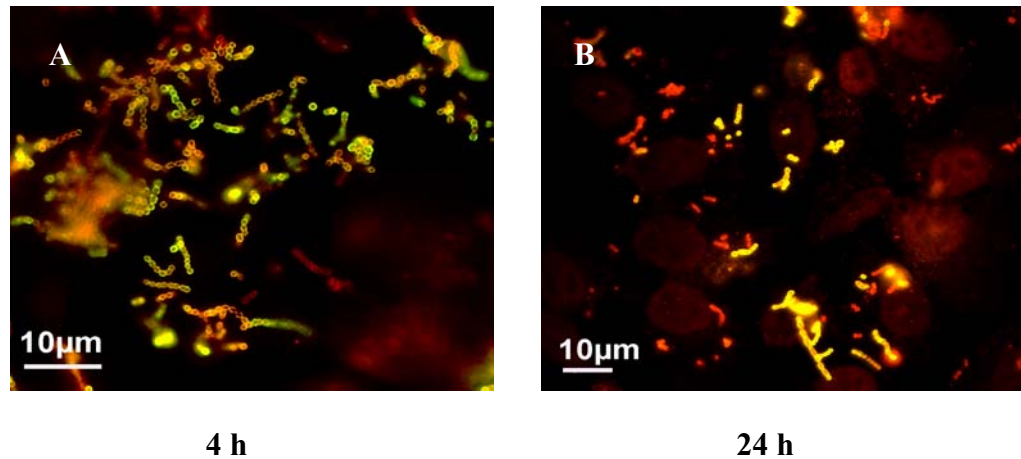
Zur Untersuchung des Invasionsmechanismus und um Erkenntnisse über die Lokalisation der in die Zellen eingedrungenen Streptokokken zu bekommen, wurden Dünnschnitte für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Zu diesem Zweck wurden HEp-2-Zellen mit dem Wildtyp G59 und der Mutante TF59 infiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten mit Glutaraldehyd und Formaldehyd fixiert (2.9.2.). Eine erste, sogenannte positiv Kontrastierung, erfolgte vor der Harz-Einbettung mit 1 % Osmiumtetroxid (2.11.3.1.). Die Entwässerung der Proben erfolgte mit Hilfe einer aufsteigenden Acetonreihe (10%-100%) vor der Einbettung in ein niederviskoses Epoxidharz (Spurr *et al.*, 1969) (2.11.3.2.). Anschließend wurden die Proben in der Ultramikrotomie geschnitten und auf Kupfergrids aufgebracht, welche mit einem Trägerfilm (Formvarfolie) beschichtet waren (2.11.3.4.). Vor dem Einführen der Grids in das Mikroskop wurde für eine erfolgreiche Bildanalyse als Nachkontrastierung eine Nachkontrastierung der Dünnschnitte durchgeführt. Als Kontrastmittel dienten Uranylacetat und Bleicitrat. Hierbei handelt es sich um Atome, die eine höherer Kernmasse besitzen als die biologischen Atome. Dadurch werden Elektronen stärker gestreut und die dadurch bedingte Verdunkelung in diesen Bereichen erhöht den Kontrast des ansonsten hell durchstrahlten Objektes. Speziell Bleicitrat führt zu einem verstärkten Kontrast von Zellmembranen (2.11.3.5.).





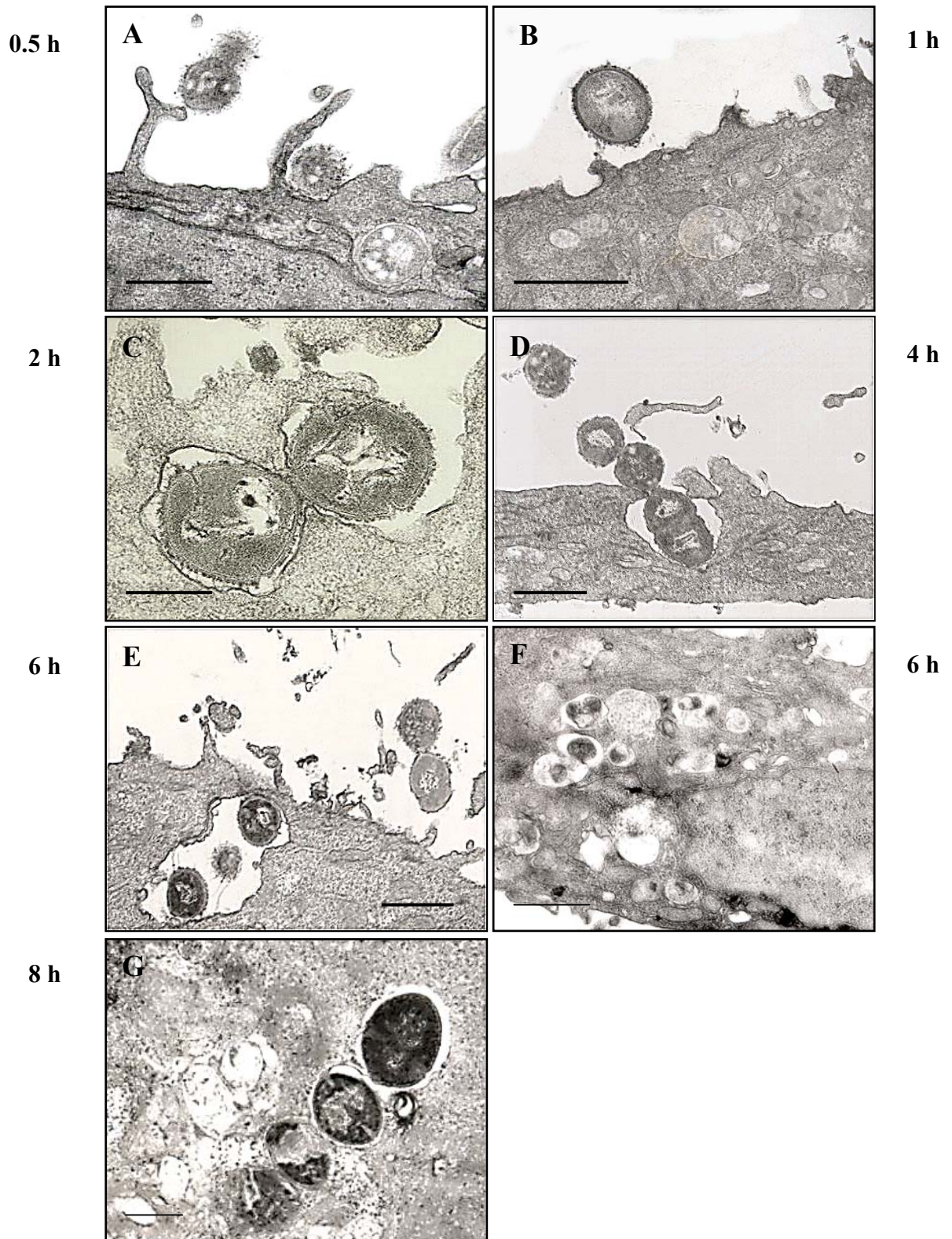
**Abb.26A:** Transmissions-Elektronenmikroskopische Analyse der Invasionsmorphologie des Wildtyps G59 in HEP-2-Zellen. Dauer der Infektion : A, B = 0.5h; C = 2h; D = 4h; E, F = 6h; G = 8h. Der Balken entspricht 0.5  $\mu\text{m}$  in C, G; 1  $\mu\text{m}$  in A, B; 2.5  $\mu\text{m}$  in D; 2  $\mu\text{m}$  in E, F.

Die Invasion des Wildtypes (Abb.26A/A) wird bestimmt durch Filopodien wie unter 3.4.5. beschrieben und eine starke Aufwölbung der Epithelzellmembran (Abb.26A/A,D). Erste Invasionen wurden nach 0.5h beobachtet. Die Aufnahmen zeigen neben Vakuolen, welche sämtliche aufgenommene Streptokokken relativ eng umschließen (B, D) auch Vakuolen, die deutlich größer sind als die darin befindlichen Bakterien (C, E, G). Dennoch kommt es partiell, d.h. bei einem Teil der aufgenommenen Streptokokken, zu einem engen Kontakt zwischen Vakuolenmembran und Bakterienoberfläche (E, G). Bei dieser Art der Vakuolen waren Membranaufwölbungen und Filopodien nicht zu beobachten (C, G). Nach 6h scheint der Prozess der Invasion weitestgehend abgeschlossen zu sein, da sich Invasionsprozesse wie unter D zu sehen nur noch selten zu beobachten sind. Bereits nach 6h tauchen Vakuolen mit Granula und Zelltrümmern auf (F). Nach 24h ist (Abb.26B) die Anzahl der Bakterien deutlich verringert. Dies lässt den Schluß zu, dass die Bakterien intrazellulär verdaut werden.



**Abb.26B:** Doppelimmunfluoreszenz-Analyse zur Abnahme der Bakterienzahl vom Wildtyps G59 während der Infektion von HEp-2-Zellen. Dauer der Infektion : A = 4h; B = 24h.

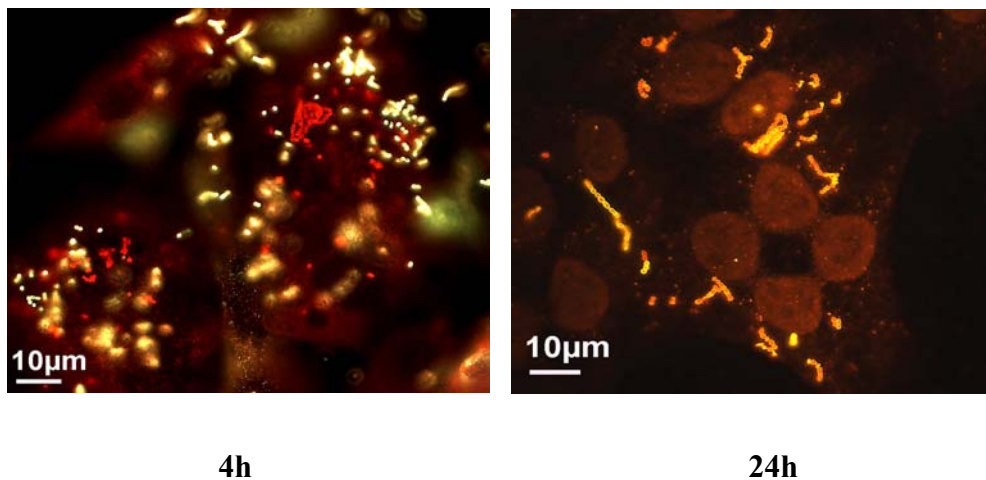




**Abb.26C: Transmissions-Elektronenmikroskopische Analyse der Invasionsmorphologie der Mutante TF59 in HEp-2-Zellen.** Infektionsdauer: **A** = 0.5h; **B** = 1h; **C** = 2h; **D** = 4h; **E, F** = 6h; **G** = 8h. Der Balken entspricht 1 µm in **A, B, D, E, F**; 0,3 µm in **C**; 0,5 µm in **G**.



Die Invasion der Mutante scheint zeitverzögert zu erfolgen, da intrazelluläre Streptokokken im Vergleich zum Wildtyp erst nach 1h – 2h zu beobachten waren (Abb.26C/C). Die Epithelzelle bildet keine auffälligen, großen Membranausstülpungen aus, sondern das unter 3.4.5. erwähnte Einsinken der Bakterien wird hier deutlich (D, E). Auf diese Weise entsteht eine Einstülpung, welche nach dem Verschmelzen der Filopodien die Einschluß-Vakuole bildet (D und E). Deutlich wird hier auch die Größe der Vakuolen, welche wesentlich größer sind als der Umfang der aufgenommenen Bakterien (D und E). Dennoch kommt es zu einem Kontakt zwischen der Bakterienwand und der Vakuolenmembran (C, D, E). Bei der Mutante konnten Invasionsprozess nach 8h kaum noch beobachtet werden. Zusätzlich tauchten wie beim Wildtyp nach 6h Vakuolen mit Zelltrümmern auf, die auf einen Verdau der Bakterien schließen lassen (F, G). Dabei scheinen die Vakuolen kleiner und die aufgenommenen Streptokokken enger zu umschließen (F, G). Die Zahl der Bakterien war ebenfalls nach 24h deutlich reduziert (Abb.26D/A und B), was auch bei der Mutante auf einen intrazellulären Verdau schließen läßt.



**Abb.26D:** Doppelimmunfluoreszenz-Analyse zur Abnahme der Bakterienzahl der Mutante TF59 während der Infektion von HEp-2-Zellen. Dauer der Infektion : A = 4h; B = 24h.

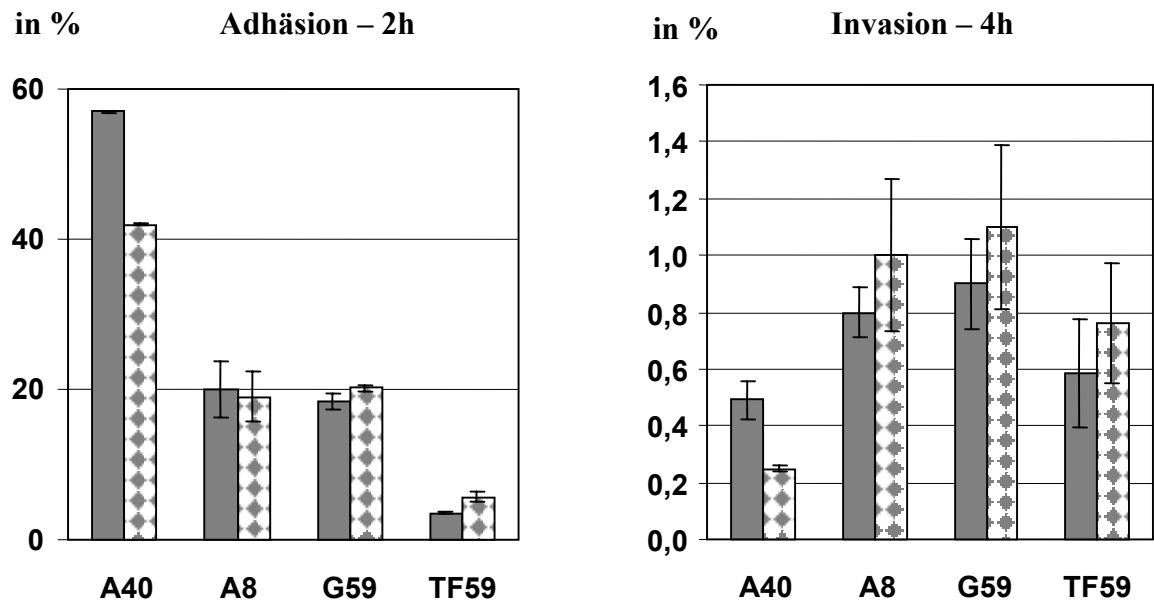
### 3.4.7. Inhibierungsstudien zur Aufklärung des Invasionsmechanismus

Um Aufschluß über die Invasionsmechanismen von Wildtyp G59 und Mutante TF59 zu bekommen, wurde der Einfluß von verschiedenen Zellstrukturen untersucht. Dazu wurden verschiedene Inhibitoren verwendet, die Einfluß auf die  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine, die Stabilität der Zellmembran und das Zytoskelett haben, sowie in die Signaltransduktion der Src-Kinase eingreifen (2.9.4.). Dadurch wurde der Ablauf der Infektion beeinflusst. Unabhängig von der Vorbehandlung wurde jeder Versuch im weiteren Verlauf wie unter 2.9.3. beschrieben durchgeführt. Jeder Ansatz wurde an verschiedenen Tagen als Triplet erfasst. Die Epithelzellen wurden nach der Versuchsdurchführung in der Doppelimmunfluoreszenz mit Phalloidin auf eine unbeschadete, typische, flach ausgestreckte Morphologie der HEp-2-Zellen hin überprüft.

#### 3.4.7.1. Inhibierung der Adhäsion und die Auswirkungen auf die Invasion

##### 1. RGD-Peptid (Adhäsion)

Dieses Peptid entspricht der RGD-Region des löslichen Fibronektins, welche mit den  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen der Epithelzell-Oberfläche interagiert und zur Bindung des ECM-Proteins an humane Zellen führt (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987). Dem RGD-Peptid fehlt die Bindungsregion für die Streptokokken. Eine externe Zugabe dieses Peptides vor der Infektion blockiert die  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine, so dass es zu keiner Interaktion der Streptokokken mit der Wirtszelle über die Fibronketinbindung kommen kann. Das *S. pyogenes* Isolat A40 diente als Positivkontrolle, da von diesem Stamm die Fibronektin vermittelte Invasion über die Integrine untersucht wurde (Molinari *et al.*, 1997; 2000). Das Isolat A8 ist ein invasiver Stamm, der kein Fibronektin bindet und nicht über die  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine in HEp-2-Zellen invadiert (Molinari *et al.*, 1997; 2000). Desweiteren ist von diesem Isolat der Invasionsmechanismus bekannt, welcher ähnlich wie bei der Mutante TF59 über ein Einsinken und reißverschlußartiges Verschmelzen der induzierten Filopodien erfolgt (Molinari *et al.*, 2000). Das Isolat A8 stellte daher die Negativkontrolle und den Vergleich für einen Fibronektin und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin unabhängigen Invasionsmechanismus dar.

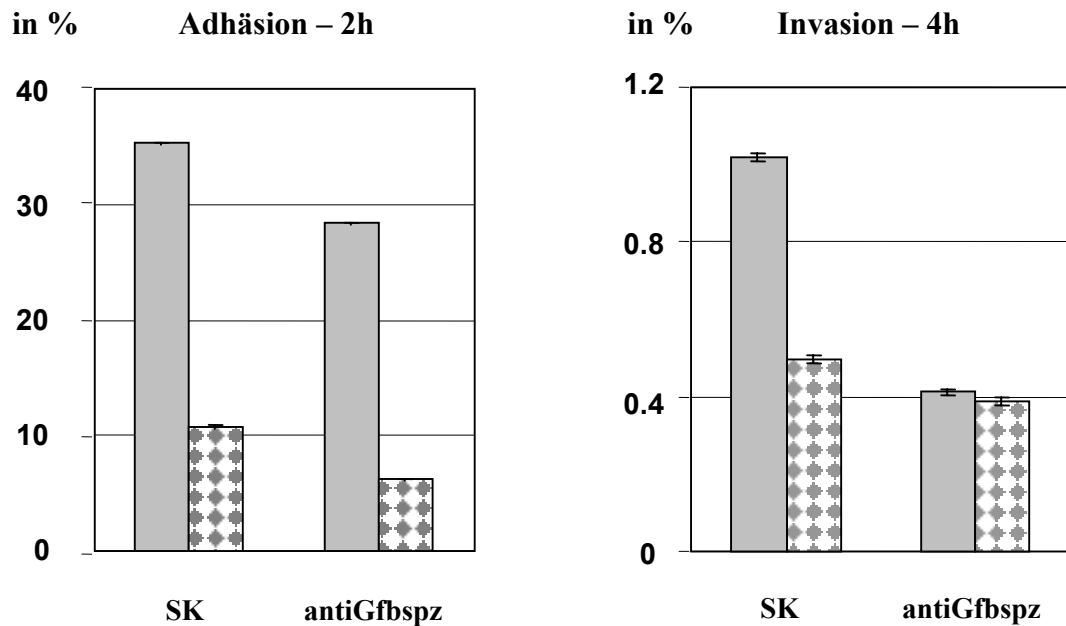


**Abb.27: Blockierung der  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine mit RGD-Peptid und der Einfluß auf die Adhäsion und Invasion.** ■ Streptokokken - Stämme ■ RGD-Peptid 25 µg/well

Bei einer Konzentration von 25 µg RGD pro well (entspricht 100 µg/ml) zeigte sich eine deutliche Reduktion der Adhäsion und Invasion für das Isolat A40. Dieser Effekt wurde auch von Molinari *et al.* (2000) beschrieben. Die Adhäsion des A40-Isolates war in ihren Versuchen um 43%, die Invasion um 67% inhibiert (Molinari *et al.*, 2000). Die Adhäsion und Invasion der Isolate A8, G59 und TF59 zeigte sich unbeeinflusst. Dies bedeutet, dass die Adhäsion und Invasion des Isolates A8 wie von Molinari *et al.* gezeigt, als auch die des Wildtyps G59 und der Mutante TF59 nicht über die  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine verläuft. Das Protein GfbI ist maßgeblich wie unter Ergebnis 3.4.3./Abb22.G59 und Ergebnis 3.4.5./Abb24 + 25 dargestellt, für den einen Adhäsions- und Invasionsmechanismus verantwortlich. Obwohl es hohe Sequenzhomologien zum gut untersuchten SfbI aufweist (Ergebnis 3.1.3. und Ergebnis 3.2.3.), ist der Prozess der Adhäsion und Invasion dennoch ein anderer. Und auch der weitere, unbekannte Mechanismus, über den die Mutante nach wie vor in der Lage ist, in die Zellen zu gelangen, verläuft unabhängig von den  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen. Es muss also weitere Faktoren an der Oberfläche der Epithelzellen geben, welche die Interaktion mit den Streptokokken der Gruppe G vermitteln. Die Invasion, die beim A40 ebenfalls reduziert ist, zeigte beim G59- und TF59-Isolat tendenziell eine leichte Verstärkung.

### 1. Spezifische Antikörper (anti-GfbIspz) gegen das Protein GfbI (Adhäsion)

Durch Inhibierung des Fibronektin bindenden Proteins GfbI, sollte Aufschluß über die Bedeutung dieses Proteins bei einer Infektion gewonnen werden. Dies gilt vor allem im Vergleich Wildtyp G59 vs Mutante TF59, so dass dieser Versuch die Ergebnisse aus 3.4.3. verifiziert.



**Abb.28: Adhäsion und Invasion nach Prä-Inkubation mit spezifischen Antikörpern (anti-Gfbpz) gegen das Protein GfbI. SK = unbehandelte Bakterien als Kontrolle.**  
 ■ Wildtyp G59 ■ Mutante TF59 Die verwendete Antikörperkonzentration betrug 25 µg/well (100 µg/ml).

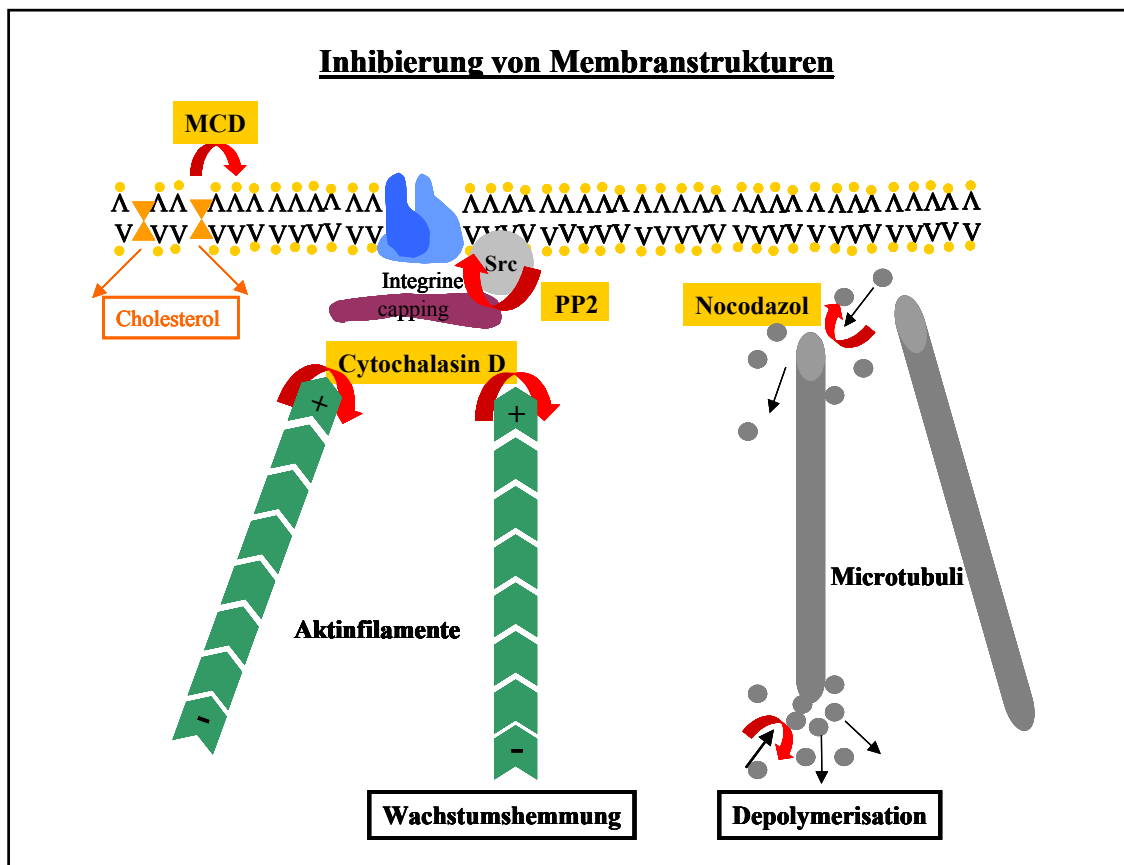
In diesem Versuch war die Adhäsion (2h) leicht reduziert, sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Mutante. Ursache für die Reduktion könnten unspezifische Bindungen zwischen unbekannten Oberflächenproteinen der Bakterien und IgGs sein, welche die Adhäsion der Bakterien an die Epithel-Zelloberfläche sterisch behindern. IgGs werden generell unspezifisch von GGS gebunden, und das in stärkerem Maß als bei den gleichzeitig untersuchten GAS (Erntell *et al.*, 1985; Myhrre and Kornvall, 1977). Es konnte auch gezeigt werden, dass das aus den Gruppe A Streptokokken bekannte SfbI-Protein in der Lage war, unspezifisch Immunglobuline zu binden (Medina *et al.*, 2000). Unabhängig davon, ob die verwendeten Antikörper spezifisch oder unspezifisch an das Protein GfbI gebunden haben, die relativ schwache Reduktion der Adhäsion macht deutlich, dass GfbI zwar alleine ausreichend (s.Latex Beads, 3.2.3.2.), aber nicht hauptverantwortlich für den Prozess der Adhäsion ist. Dies legte die Vermutung nahe, dass weitere Oberflächenproteine gibt, welche zusätzlich die Adhäsion vermitteln.

Deutlich reduziert hingegen war jedoch die Invasion (4h) des Wildtyps und zwar auf das Niveau der Mutante. Dies Ergebnis zeigte hier deutlich die Funktionalität der Antikörper, welche das GfbI-Protein offensichtlich spezifisch blockieren. Die Invasivität des Wildtyps wurde dadurch auf das Niveau der Mutante gesenkt. GfbI ist für einen Invasionsprozess verantwortlich, welcher durch die Antikörper vollständig blockiert werden konnte. Dies bewies über das eigentliche Versuchsziel hinaus erneut das Fehlen des Proteins auf der Oberfläche der Mutante. Dieser Versuch zeigte desweiteren, dass unabhängig von der GfbI-vermittelten Invasion zusätzlich ein weiterer Invasionsprozess abläuft. Die Invasion der Mutante (4h) wurde nach erfolgter Antikörper-Inkubation nur

leicht reduziert. Dies könnte auf eine sterische Behinderung durch unspezifische Antikörperbindung zurückgeführt werden.

### 3.4.6.1. Modifikation der Membranbeschaffenheit führt zu veränderter Adhäsion und Invasion

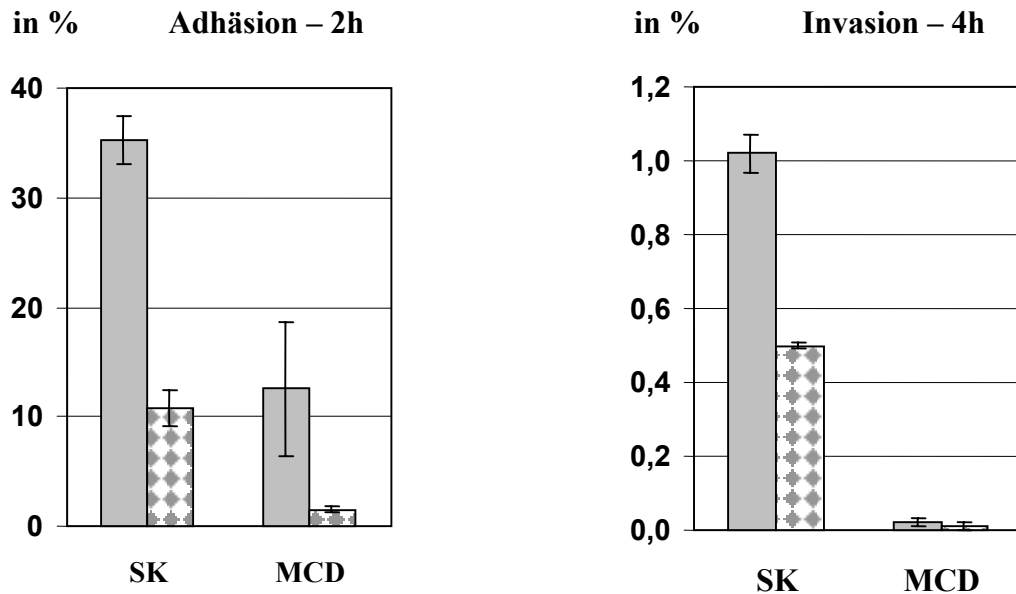
Die Ergebnisse aus 3.4.7.1. zeigten, dass es weitere Mechanismen und weitere Faktoren an der Oberfläche der Epithelzellen geben muss, mit denen die GGS unabhängig vom Protein Gfbl (TF59) und ohne Beteiligung der  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine in Wechselwirkung treten. Um die beteiligten Faktoren der Wirtszelle genauer zu untersuchen, wurden im Infektionsversuch vor der Infektion der HEp-2-Zellen verschiedene Inhibitoren zugesetzt. Diese sollten durch Blockierung Aufschluß über beteiligte Membranstrukturen und involvierter Proteine geben. Die Versuche wurden wie unter 2.9.4. beschrieben durchgeführt.



**Abb.29: Modell zum schematischen Überblick über die Wirkung der verwendeten Inhibitoren** Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD), Cytochalasin D, Nocodazol und Src-Kinase-Inhibitor PP2.

### 3. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MCD) (Invasion)

Bei Methyl- $\beta$ -cyclodextrin handelt es sich um cyclische Glucose-Oligomere, welche lipophile Substanzen aus einem hydrophoben Umfeld herauslösen. Es konnte gezeigt werden, dass Cyclodextrine Cholesterol aus der Zellmembran von Epithelzellen herauslösen (Neufeld *et al.*, 1996; Pitha *et al.*, 1988). Dadurch werden endocytotische Prozesse unter Beteiligung von Caveolae inhibiert, wie es bei der SfbI vermittelten Invasion von GAS gezeigt wurde (Rohde *et al.*, 2003). Es wurde eine Konzentration von 10 mM/well Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) verwendet.



**Abb.30: Inhibierung der Adhäsion und Invasion von ■ Wildtyp G59 und ■ Mutante TF59 mittels MCD (10mM/well). SK = unbehandelte Bakterien.**

Durch die Behandlung mit MCD ist die Adhäsion (2h) bei Wildtyp und Mutante deutlich reduziert. Die Invasion (4h) ist bei beiden Bakterienstämmen vollständig inhibiert. Parallele Doppelimmunfluoreszenz-Kontrollen zeigten, dass dies nicht an der Zerstörung der HEp-2-Zellen lag, da diese nur eine leicht abgerundete Morphologie aufwiesen. Der Wildtyp war in der Lage, trotz veränderter Membranbeschaffenheit an Oberflächenproteine der Epithelzellen zu binden und zu adhären. Diese Adhäsion war jedoch deutlich reduziert. Die Mutante war nicht mehr in der Lage, an die Zellen zu binden. Dies lässt die Vermutung zu, dass das Protein GfbI des Wildtypes bestimmte Oberflächenproteine der Epithelzelle auch nach der MCD-Behandlung erkennt und für die verbleibende Adhäsion verantwortlich ist. Die für die Invasion der Bakterien wichtigen Ausstülpungen der Zellen (Ergebnis 3.2.4.2. und Ergebnis 3.4.5.) sind vermutlich ohne die Fluidität und Biegsamkeit der Membranen nicht möglich. Dies verifiziert die Bedeutung dieser Membranbewegungen für die Invasion von Gruppe G Streptokokken.

Auch beim *S. pyogenes* Isolat A40 konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion möglich, die Invasion jedoch inhibiert wurde (Rohde *et al.*, 2003). Trotz ähnlicher Sequenzen der Proteine GfbI und SfbI und trotz unterschiedlicher Invasionswege von Wildtyp G59 (Membranfaltungen) (Ergebnis 3.1.3. und Ergebnis 3.2.3.) und dem Isolat A40 (Invaginationen), scheint die Membranbeschaffenheit generell von großer Bedeutung für die Invasionsprozesse zu sein.

#### **3.4.6.2. Inhibierungsstudien zur Klärung des an der Invasion beteiligten Zytoskelettes**

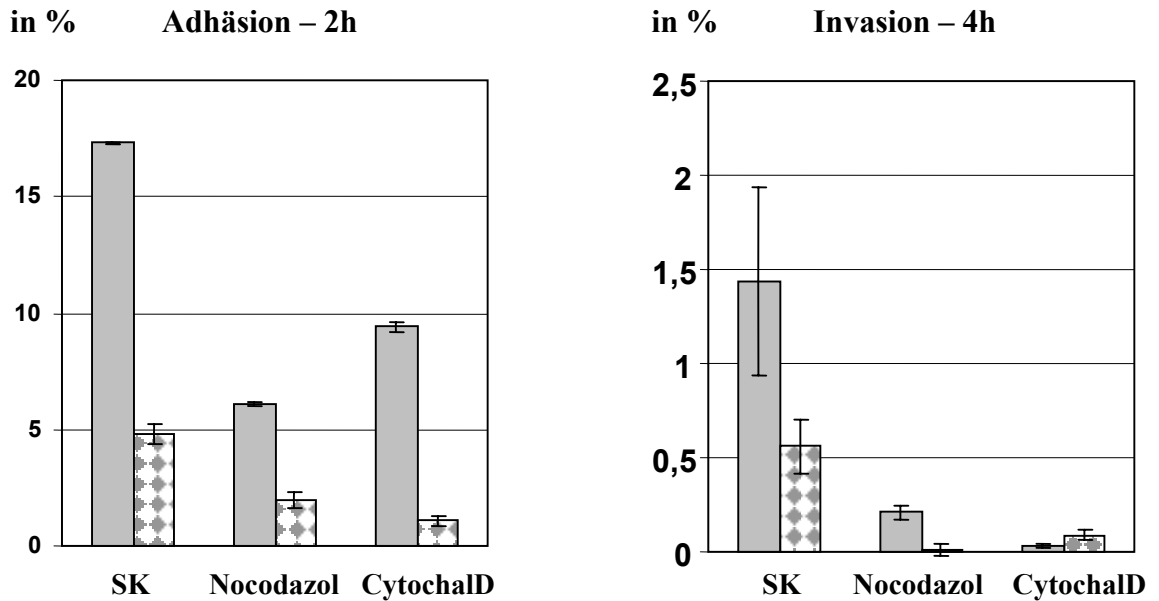
Die Struktur und Beschaffenheit der Zellmembran spielt eine entscheidende Rolle bei der Invasion der Bakterien (3.4.7.2.). Membranausstülpungen wie Lamellipodien, Filopodien und Mikrospikes sind immer mit einer Umorganisation des Aktinfilamentsystems verbunden. Verschiedene Inhibitoren, die gezielt den Auf- und Abbau der Aktinfilamente verhindern, wurden daher verwendet, um den Einfluß dieses Systems zu untersuchen.

#### **4. Cytochalasin D (Invasion)**

Diese Substanz inhibiert die Polymerisation von Aktinfilamenten durch Blockierung des wachsenden +-Pols. Dadurch werden Membranstrukturen wie Filopodien und Lamellipodien beeinflusst (Kok *et al.*, 1992). Die Filamente bleiben für kurze Zeit in der Peripherie stabil, werden aber durch die langsame Depolymerisation am nicht wachsenden Ende langsam abgebaut. Im Versuch wurden 20 µg/ml Cytochalasin D verwendet und die Zellen 15 Min. vor der Infektion mit den Bakterien G59 und TF59 inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine Doppelimmunfluoreszenz angefertigt, um den Erhalt der Epithelzellmorphologie zu verifizieren.

#### **5. Nocodazol (Invasion)**

Diese Substanz nimmt Einfluß auf die Polymerisation von Mikrotubuli. Nocodazol inhibiert die Anlagerung neuer Mikrotubulin-Einheiten ( $\alpha\beta$ ) an bestehende Mikrotubuli-Filamente. Mikrotubuli haben ein hohes dynamisches Gleichgewicht, so dass die Inhibierung der Neubildung zu einem sehr schnellen Abbau des gesamten Filamentes führt. Die Funktion der Mikrotubuli als Transportfilament und Zulieferer von wichtigen Bausteine für den Auf- und Abbau von Membranstrukturen geht dadurch verloren. Konkret werden auch die Prozesse zum Aufbau von Aktinfilamenten und zur Verankerung dieser in der Zellmembran inhibiert (Kok *et al.*, 1992). Im Versuch wurden 20 µg/ml Nocodazol verwendet, die HEP-2-Zellen 90 Min vor der Infektion damit inkubiert und ebenfalls eine DIF-Kontrolle durchgeführt.



**Abb.31: Modifikation von Membranausstülpungen durch Inhibierung des Aktinfilament-Systems und die Auswirkung auf die Adhäsion (2h) und Invasion (4h) von  Wildtyp G59 und  Mutante TF59.** SK = unbehandelter Ansatz. Die Konzentration der verwendeten Substanzen betrug 20 µg/ml.

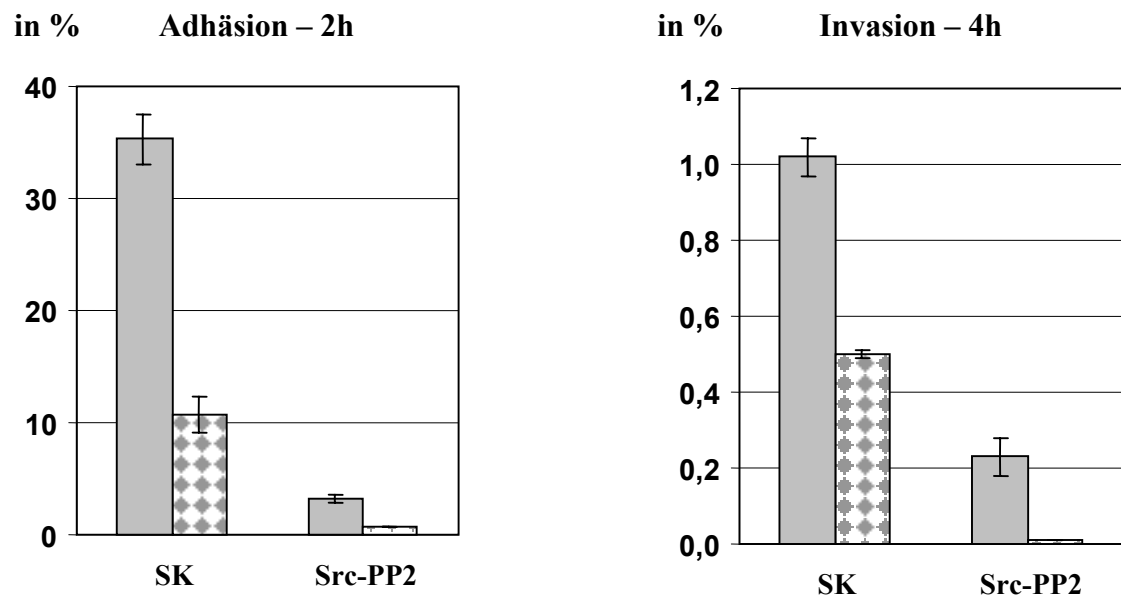
Für beide Substanzen gilt, dass die Adhäsion sowohl beim Wildtyp, als auch bei der Mutante deutlich reduziert war. Dabei sinkt die Adhäsion des Wildtyps nicht auf den Level der Mutante, sondern der Unterschied zwischen beiden Isolaten blieb bestehen. Die Invasion war beim Isolat G59 und TF59 deutlich inhibiert. Der Einfluss von Nocodazol auf die Mikrotubuli und damit indirekt auf die Umorganisation von Aktinfilamenten ist ein weiterer Beweis dafür, dass das Aktinskelett für eine erfolgreiche Invasion unabdingbar ist. Dies gilt für die vom GfBI hervorgerufenen Lamellipodien und Filopodien (G59) als auch für den seitlichen Einsinkmechanismus mit anschließendem, reißverschlußartigem Übergreifen von neu gebildeten Filopodien (G59+TF59).

## 6. Src-PP2 – ein Src-Kinase-Inhibitor

Die Src-Kinase phosphoryliert Tyrosinreste verschiedenster Substratproteine, die unter anderem beim Auf- und Abbau von capping-Strukturen in einer humanen Zelle beteiligt sind (Agerer *et al.*, 2003). In diesen capping-Strukturen finden sich unter anderem Transmembranproteine, durch welche die Zelle mit der ECM in Verbindung steht. Capping-Strukturen stellen desweiteren einen Verankerungspunkt von Aktinfilamenten in der Zellmembran dar (Alberts *et al.*, 1996). Äußere Reize werden somit in diesen capping-Strukturen über die Transmembranproteine direkt auf das verankerte Aktinfilamentsystem weitergeleitet. Die Zelle kann auf diese Reiz



mit einer Reorganisation des Aktinskelettes reagieren. Als Schlüsselenzym erfüllt hierbei die Src-Kinase eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion und ist daher in der Nähe der capping-Strukturen zu finden. Der Inhibitor der Src-Kinase, Src-PP2, wurde in einer Konzentration von 1mM 15 Min vor der Infektion mit Wildtyp G59 und Mutante TF59 zu den HEp-2-Zellen gegeben.



**Abb.32: Modifikation der Aktinfilament-Organisation durch Inhibierung mit einem Src-Kinase-Inhibitor (Src-PP2) und die Auswirkung auf die Adhäsion (2h) und Invasion (4h) von  Wildtyp G59 und  Mutante TF59.** SK = unbehandelter Ansatz. Es wurden 1 mM des Inhibitors Src-PP2 verwendet.

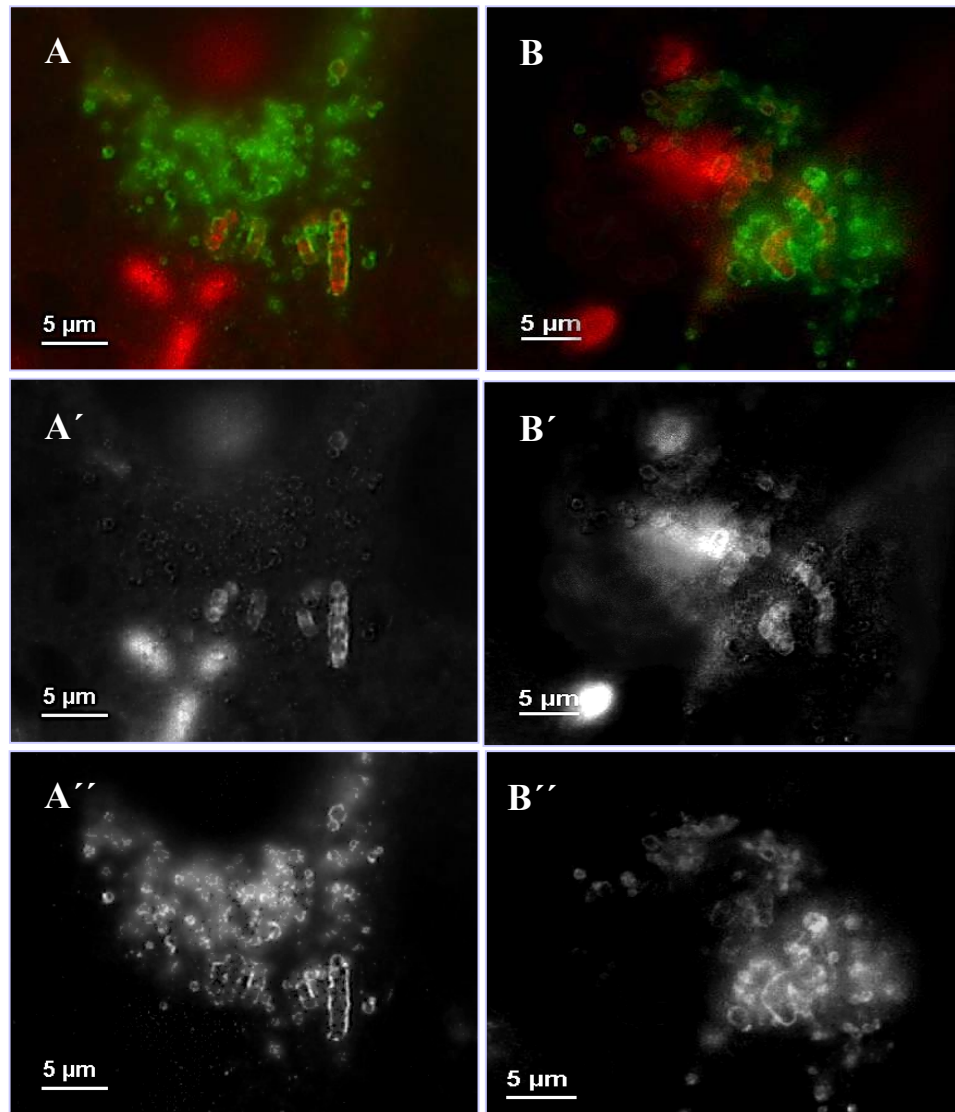
Sowohl die Adhäsion als auch die Invasion wird bei G59 und TF59 reduziert und nahezu vollständig inhibiert. Durch die Inhibierung der Src-Kinase wurde die Verankerung von Aktinfilamenten in den Capping Strukturen verhindert. Dies könnte bedeuten, dass diese Strukturen für die Adhäsion der Gruppe G Streptokokken von Bedeutung sind. Dabei kann die reduzierte Invasion sicher auch auf die fehlende Adhäsion zurückzuführen sein.

### **3.4.8. DIF-Analysen zur Untersuchung des Verbleibes der GGS in der Wirtszelle**

Der Invasionsmechanismus und der Verbleib der Streptokokken in verschiedenen Wirtszellkompartimenten sollte im folgenden Versuch mit Hilfe der Doppelimmunfluoreszenz (DIF) untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Infektionsversuch wie unter 2.9.1. beschrieben durchgeführt. Nach der Fixierung der Epithelzellen und der Streptokokken auf den Deckgläschen wurden die HEp-2-Zellen mit Triton-X-100 (0.1%) permeabilisiert. In einer anschließenden Antikörperinkubation wurde in verschiedenen Ansätzen zunächst ein anti-Lamp1-Antikörper verwendet (Abb.33), bzw. ein anti-Clathrin-Antikörper (Abb.34) und die Detektion in einem zweiten Inkubationsschritt mit Alexa488 (grün) sichtbar gemacht (2.3. und 2.11.1). Anschließend wurden die Streptokokken mit einem anti-GGS-Antikörper (Kaninchen) inkubiert und im zweiten Schritt mit einem anti-Kaninchen-Alexa595 (rot)-markiertem Antikörper detektiert.

#### **Kolokalisation mit Lamp1 (Lysosomen)**

Bei Lamp1 handelt es sich um ein Protein, welches in der Membran von Lysosomen und späten Endosomen vorkommt. Eine Detektion dieses Proteins markiert die Lage dieser Organellen innerhalb einer Zelle. Über eine Kolokalisation kann Aufschluß über einen möglichen Verbleib von invasiven Streptokokken in Lysosomen, bzw. späten Endosomen gewonnen werden.

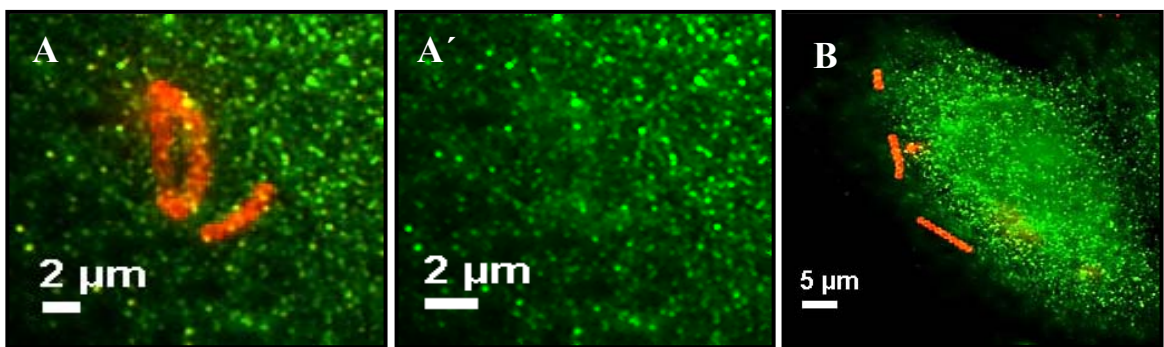


**Abb.33: Kolokalisations-Experiment mit Lamp1.** Infektion von HEp-2-Zellen mit Fixierung nach 4h. Detektion des Lysosomenmarkers Lamp1 (Grün) und der Bakterien (rot). **A** = Wildtyp G59; **B** = Mutante TF59. **A'**, **B'** = Rotkanal; **A''**, **B''** = Grünkanal. Aufnahmen erfolgten mit einer Zeiss Axiocam-HRc-Kamera.

Die Abbildungen in **A** und **B** zeigen, dass die Bakterien nach 4h Inkubationszeit in den Lysosomen der HEp-2-Zellen lokalisiert sind. Dies gilt sowohl für den Wildtyp G59 (**A**), als auch für die Mutante TF59 (**B**). Die Bakterien (rot) sind von einer durch den Lamp1-Antikörper detektierten Organellmembran umschlossen. Deutlich wird dies auch durch die Auflösung der beiden Farbkanäle in einen Rotkanal (**A'**, **B'**) und einen Grünkanal (**A''**, **B''**). In ersterem sind ausschließlich die Bakterien zu sehen, welche sich durch ihre runde Zellmorphologie deutlich abgrenzen. Im Grünkanal sind die Bakterien ausgeblendet und die markierte Lysosomenmembran wird als grünlicher Ring um die Streptokokken deutlich sichtbar. Dies beweist, dass die detektierte, grünlich-markierte Membran aufgrund ihrer Form unabhängig von der Bakterienzellwand existiert und eine Organellmembran darstellt.

### Kolokalisation mit Caveolin-1 (Caveosomen)

Bei der Invasion von Gruppe A Streptokokken Isolat A40 kommt es zur Ausbildung von Caveolae. Caveolin-1 ist ein Markerprotein der Caveolae, bei denen es sich um Einstülpungen der Wirtszellmembran handelt. Kleine, Caveolin-1haltige Vesikel akkumulieren in der nahen Umgebung der adhärenen Bakterien. Dieser Effekt konnte durch rekombinantes SfbI- Protein ausgelöst werden und zeigte sich auch bei der Invasion des A40-Isolates (Rohde *et al.*, 2003). Durch die Fusion dieser Vesikel mit der Zellmembran und untereinander kommt es zu großen Einstülpungen (Invaginationen). Diese sind in der Doppelimmunfluoreszenz als ringförmige Strukturen an einem Pol der Bakterienkette zu sehen. Nach der Invasion verbleiben die Bakterien relativ kurz in diesen frühen Caveolin-1 Endosomen, auch Caveosomen genannt (Rohde *et al.*, 2003). Mit Hilfe des Kolokalisationsexperimentes sollte analysiert werden, ob der Wildtyp und die Mutante ebenfalls nach Rezeptor-vermittelter Endocytose in diesen frühen Organellen, den Caveosomen, detektiert werden können.

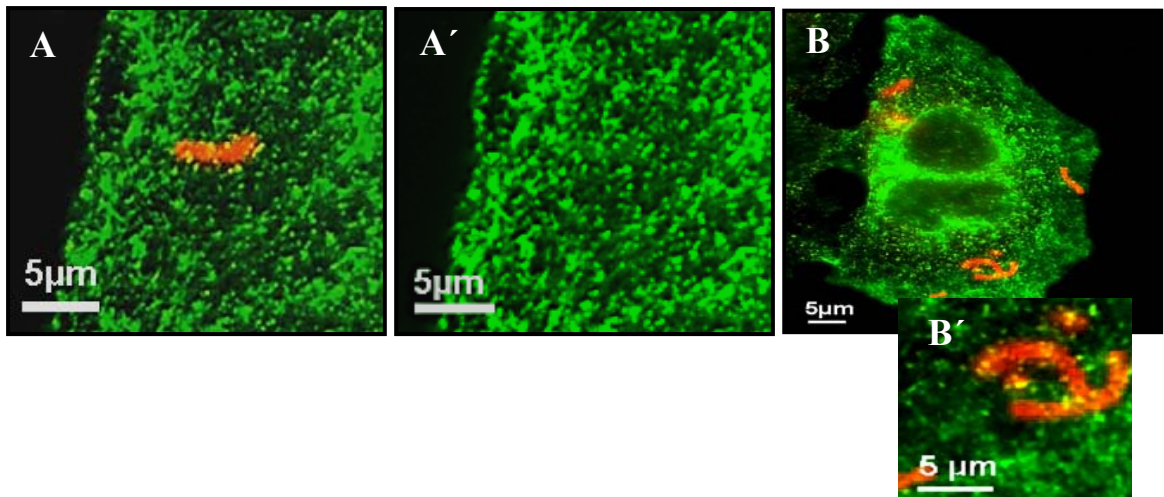


**Abb.34: Kolokalisations-Experiment mit Caveolin-1.** Infektion von HEp-2-Zellen. Fixierung nach 30 Min. Detektion von Caveolin (Grün) und der Streptokokken (rot). **A**, **A'** = Wildtyp G59; **B** = Mutante TF59. Aufnahmen erfolgten im Doppelfluoreszenzfilter (**A**, **B**), bzw. im Grünkanal (**A'**) mit einer Zeiss Axiocam-HRc-Kamera.

Es konnte weder bei dem Wildtyp G59, noch bei der Mutante TF59 eine Kolokalisation festgestellt werden. Sowohl die Bakterien (rot), als auch Caveolin-1haltige Vesikel (grün) konnten detektiert werden. Ringförmige Strukturen am Pol einer Bakterienkette waren nicht zu beobachten, auch nicht bei höherer Vergrößerung. Daraus lässt sich schließen, dass die Streptokokken G59 und die Mutante TF59 nicht über Caveolae in die Zelle und im folgenden auch nicht in Caveosomen (Rohde *et al.*, 2003) als primäre Organelle gelangen. Dies bestätigt die elektronenmikroskopischen Ergebnisse (s.3.4.5. und 3.4.6.).

### Kolokalisation mit Transferrin (frühe Endosomen)

Transferrin ist ein Transportprotein für Eisen im Blut. Es wird über einen Rezeptor vermittelte Endocytose in die Zelle aufgenommen und gelangt in die frühen Endosomen. In diesem Versuch wurde Transferrin (0.5 mg/ml) 15 Min vor der Infektion auf die ruhenden Zellen gegeben und nicht von der Zelle aufgenommenes Transferrin vor der Infektion durch Waschen entfernt. Die anschließende Infektion mit Wildtyp und Mutante wurde nach 60 Min durch Fixierung gestoppt (2.9.1.) Durch die direkte Kopplung von Alexa488 an das Transferrin konnte das Protein in der DIF grün detektiert werden (s.2.11.1). Die Analyse sollte Aufschluß darüber geben, ob es zu einer Kolokalisation zwischen Transferrin (Alexa488-grün) und Streptokokken (Alexa595-rot) kommt. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass sich die Bakterien nach Aufnahme in die Zelle in frühen Endosomen befinden.



**Abb.35: Kolokalisations-Experiment mit Transferrin .** Die Fixierung erfolgte nach 60 Min Infektion. Detektion des Endosomenmarkers Transferrin (Grün) und der Bakterien (rot). **A, A'** = Wildtyp G59; **B, B'** = Mutante TF59. Aufnahmen erfolgten im Doppel-fluoreszenzfilter (**A, B, B'**), bzw. im Grünkanal (**A'**) mit einer Zeiss Axiocam-HRC-Kamera.

Es konnten Cluster von Transferrinrezeptoren detektiert werden (grün). Es konnte aber zu keinem Zeitpunkt eine ringförmige Struktur als eine Art Organellmembran um eine Streptokokkenkette (rot) detektiert werden. Das typische Bild einer Farbüberlagerung, bei der sich Bakterien und Transferrin in einer Art Vakuole, bzw. rundem Endosom befinden, konnte nicht detektiert werden. Gelbliche, punktuelle Farbüberlagerung wie in **Abb. 35/Bild A und B'** zu beobachten ist, ist auf ein Durchstrahlen der Färbung zurückzuführen. Die typische und morphologisch sichtbare Kolokalisation ist daraus nicht abzuleiten. Daraus folgt, dass der Wildtyp und die Mutante nicht über Rezeptor-vermittelte Endocytose über den Transferrin-Pathway in die Zelle aufgenommen werden und sich im folgenden auch nicht in den typischen Transferrin-Endosomen befinden.

#### 4. Diskussion

Streptokokken der Gruppe G sind als humanpathogene Erreger beschrieben worden. Sie weisen eine Vielzahl von Virulenzfaktoren auf, die ihnen eine Interaktion mit dem Wirt ermöglichen. Entscheidend für die Etablierung einer Infektion in Gewebe und Blut sind jedoch Oberflächenproteinen, die eine Adhäsion und Kolonisierung des Wirtes überhaupt erst ermöglichen. So wird die Bindung an humanes Kollagen, ein Hauptbestandteil der Basallamina, für *S. equi* und *S. zooepidemicus* beschrieben (Lannergard *et al.*, 2003; Visai *et al.*, 1995). GGS können an Vitronektin binden (Chhatwal *et al.*, 1987), welches die Adhäsion an humane Epithel- und Endothelzellen vermittelt (Filippsen *et al.*, 1990).

Fibronektin ist ein weiteres, wichtiges Wirtsprotein, welches sowohl im Gewebe in fibrillärer Form, als auch in der Mucosa als gelöstes Protein vorkommt. Fibronektin verfügt über Bindungsstellen für Fibrinogen und Kollagen, und ist als Multifunktionsprotein somit ein wichtiges Adhäsionsprotein für die Bakterien. Verschiedene Fibronektin bindende Proteine wurden bereits für Streptokokken der Gruppe A beschrieben: SfbI (Talay *et al.*, 1992), das PrtF-Protein (Hanski *et al.*, 1992) F2 (Jaffe *et al.*, 1996), Fba (Terao *et al.*, 2001), M3 (Schmidt *et al.*, 1993), M1 (Cue *et al.*, 1998) und FBP54 (Courtney *et al.*, 1994). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass diese Fibronektin bindenden Proteine der GAS nicht nur die Adhäsion vermitteln (Hanski *et al.*, 1992; Valentin-Weigand *et al.*, 1994), sondern auch für die Invasion der Bakterien in Epithelzellen verantwortlich sind (Molinari *et al.*, 1997; Talay *et al.*, 2000). Vor allem für das SfbI-Protein konnte gezeigt werden, dass die Bindung an das 70 kDa-Fragment des Fibronektins ausreichend ist, um die Adhäsion an Epithelzellen zu bewirken. Dabei wird die Bindung des Fibronektins über seine RGD-Region an die  $\alpha_5\beta_1$ -Interine der Wirtszelle genutzt. Für die folgende Invasion ist ein weiteres Fragment des Fibronektins nötig, welches zusammen mit dem 70 kDa-Fragment des Fibronektins ein 120 kDa-Fragment ergibt (Molinari *et al.*, 1997; Talay *et al.*, 2000).

Bei Gruppe G Streptokokken ist bis heute jedoch nur das Protein GfbA als Fibronektin bindendes Protein bekannt (Kline *et al.*, 1996). Es handelt sich dabei um ein SfbI, bzw. PrtF Homolog. In dieser Arbeit konnte ein Gruppe G Stamm identifiziert werden (G59), der an das 70 kDa-Fragment des Fibronektins bindet. Das Isolat G59 war in der Lage, 85% des eingesetzten, radioaktiv markierten Fibronektin-Fragmentes zu binden. Dies entsprach dem Bindungspotential des eingesetzten GAS Stammes A20 (SfbI+), der als Positivkontrolle diente (s.3.1.1.).

Mit einer Sonde gegen das bekannte *sfbl*-Gen aus *S. pyogenes* Isolat A20 (DSMZ 2071) konnte mittels eines Southern Blots ein *sfbl*-Homolog im Isolat G59 gefunden werden. Dieses Homolog wurde *gfbI*, das zugehörige Protein GfbI benannt. Sequenzvergleiche zu bekannten Fibronektin bindenden Proteinen ergaben hohe Homologien zu SfbI und GfbA, sowohl auf DNA-, als auch auf Proteinebene. Für die Herkunft vieler Virulenzfaktoren der Gruppe G Streptokokken ist ein horizontaler Gentransfer aus den Gruppe A Streptokokken beschrieben. Hierzu gehören die M-Proteine (Sriprakash *et al.*, 1996), die C5a-Peptidase (Cleary *et al.*, 1991), die

Superantigene (Sachse *et al.*, 2002, Kalia *et al.*, 2001 und 2003, Franken *et al.*, 2001,) und die Streptokinase (Walter *et al.*, 1989). Auch für das *sfbI*-Gen aus *S. pyogenes* wurde die für einen horizontalen Transfer typische Mosaikstruktur mit Kassetten und Wiederholungen der Gensequenz in verschiedenen Gruppe A-Isolaten gefunden (Towers *et al.*, 2003). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch das Gen *gfbI* über einen horizontalen Gentransfer von Streptokokken der Gruppe A übertragen wurde.

GfbA konnte als Fibronectin bindendes Protein und als Adhäsion klassifiziert werden (Kline *et al.*, 1996). Der Beweis hierzu konnte jedoch nur indirekt erbracht werden, indem GfbA<sup>+</sup>-Stämme sowohl an lösliches, radioaktiv-markiertes Fibronectin binden konnten, als auch an humane Hautfibroblasten. Durch Vorinkubation mit Fibronectin konnten beide Bindungen unterbunden werden. Desweiteren zeigte ein GfbA negativer, nicht adhärenter Stamm den Phänotyp des Wildtyp-Stammes, nachdem das *gfbA*-Gen in diesen Stamm transformiert wurde.

Das rekombinante Protein GfbI wurde in dieser Arbeit aus dem Isolat G59 durch Klonierung, Überexpression und Aufreinigung gewonnen, um die Funktion des im Isolat G59 gefundenen SfbI-Homologes zu analysieren. Ein Overlay-Blot zeichnete das rekombinante Protein GfbI als tatsächlich Fibronectin bindendes Protein aus (s.3.2.2.). In dieser Arbeit konnte desweiteren gezeigt werden, dass es an Latex Beads gekoppelt nicht nur die Adhäsion an humane Epithelzellen vermittelt, sondern zusätzlich als Invasin fungiert. Als solches ist es alleine ausreichend, um die Invasion zu induzieren. Den Beweis der Invasion erbrachte die Doppelimmunfluoreszenz. In diesem Versuch konnten Latex Beads detektiert werden, die sich eindeutig intrazellulär befanden (s.3.2.3.).

In der Rasterelektronenmikroskopie ergaben Latex Beads, welche mit dem rekombinanten Protein GfbI gekoppelt waren, einen ersten Aufschluß über die Morphologie der Epithelzelloberfläche während der Invasion (Invasionsmorphologie). Dabei zeigte sich, dass GfbI eine Faltung der Epithelzellmembran verursacht, welche sich über die GfbI-gekoppelten Latex Beads wölbt, diese einschließt so dass sich die Beads nach Verschmelzen der Membranfalte mit der Epithelzellmembran intrazellulär befinden (s.3.2.3.).

Bei der Fibronectin vermittelten Invasion von Epithelzellen durch GAS sind verschiedene Invasionsmorphologien bekannt. So wurden beim *S. pyogenes* Isolat A40, welcher ein Fibronectin bindender, SfbI-positiver Stamm ist, Membraneinstülpungen beobachtet. Auch zeigte mit Gold markiertes rekombinantes SfbI aus dem Stamm A20 (DSMZ 2071) auf HUVEC-Zellen nach 30-40 Min eine zunehmende Aggregation auf der Zelloberfläche. Rekombinantes SfbI Protein (Rohde *et al.*, 2003), welches aus der Membranankerregion, der Fibronectin bindenden Repeats, der Fibronectin bindende Spacer und den prolinreichen Repeats besteht, konnten nach 2h Protein-Aggregate in neu gebildeten Membraneinstülpungen detektiert werden. Mittels rekombinantem SfbI-Protein konnte gezeigt werden, dass die Membraneinstülpungen als Invasionsmorphologie mit dem Protein SfbI korrelieren (Rohde *et al.*, 2003). Dennoch wurden bei einem *S. gordonii* Stamm (SGO30), welcher das rekombinante Protein auf seiner

Oberfläche exprimierte, zusätzlich zu den Membraneinstülpungen auch Membranfaltungen beobachtet (Talay, unpubliziert).

Bei dem Invasionsweg über die Invaginationen des *S. pyogenes* Isolates A40 erfolgte die Invasion ohne Beteiligung des Aktinzytoskelettes (Molinari *et al.*, 2000). Weiterhin ist für den Mechanismus der Invagination eine Interaktion mit den  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen der Zelle bekannt. Werden die Integrine durch Bindung eines RGD-Peptides blockiert, reduziert sich sowohl die Adhäsion (40%), als auch die Invasion (67%) des untersuchten A40-Isolates (Molinari *et al.*, 1997). Dies zeigt auch, dass trotz der Reduktion unabhängig vom Invasionsweg über  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine ein gewisser Prozentsatz der Bakterien dennoch adhärieren und invadieren kann. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist unbekannt.

Obwohl die Stämme A40 (Rohde *et al.*, 2003), A20, SGO30 (Talay, unpubliziert), G59 (diese Arbeit) ein homologes Fibronectin bindendes Protein auf ihrer Oberfläche exprimieren, zeichnen sie sich durch ein sehr unterschiedliches Invasionsverhalten aus. Die Ursache dieser unterschiedlichen Invasionswege trotz ähnlichem Oberflächenproteins könnte in der Struktur des Proteins selbst liegen. Veränderungen in der Aminosäuresequenz, bzw. Veränderung der funktionalen Domänen (z.B. deren Anzahl), können zu einer unterschiedlichen Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins führen. Dies wiederum bewirkt eine Modifikation in der Funktionsweise des Proteins. Talay *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Bindung an Fibronectin über die Fibronectin bindenden Repeats des SfbI zur Adhäsion der Streptokokken führt. Erst mit der erfolgreichen Bindung der Fibronectin bindende Repeats erfolgt die Exposition des Fibronectin bindende Spacer I. Dieser interagiert mit der entsprechenden Bindungsregion des Fibronectins und induziert so die Invasion in die Epithelzellen. Ohne den Spacer I können die Bakterien zwar über die RGD-Region des Fibronectins an die Integrine der Wirtszelle adhärieren, sind aber nicht zur Invasion in der Lage Talay *et al.* (2000).

In einem SfbI-negativen *S. gordonii* Stamm wurden unterschiedliche, rekombinante SfbI-Proteine aus dem Stamm A20 exprimiert, welche sich in der Anzahl der Prolin-Repeats unterschieden (Talay, unpubliziert). Jeder transformierte Stamm war zur Adhäsion und zur Invasion fähig. Der Stamm SGO30, welcher ein rekombinantes SfbI-Protein mit typischen Prolin-Repeats auf der Bakterien-Oberfläche exprimierte, wurde sowohl über Membranfaltungen, als auch über Membraneinstülpungen in die Epithelzellen aufgenommen. Auffällig ist hierbei, dass das aufgereinigte, rekombinante Protein dieses Stammes ausschließlich Membraneinstülpungen verursachte (siehe oben und Rohde *et al.*, 2003). Es existiert also ein Unterschied in der Invasionsmorphologie in Abhängigkeit davon, ob das rekombinante Protein separat verwendet wird, oder aber auf der Oberfläche der Bakterien exprimiert wird.

Der Stamm SGO31 hingegen exprimierte ein rekombinantes SfbI auf seiner Oberfläche ohne Prolin-Repeats. Dieser Stamm gelangte ausschließlich über Membraneinstülpungen in sogenannte Caveosomen. Dies beweist desweiteren eindrucksvoll, dass Veränderungen in den Proteindomänen (Prolin-Repeats) einen direkten Einfluß auf die



Struktur und somit auf die Funktion des Proteins und folglich auf den Invasionsmorphologie haben.

Untersuchungen zur Proteinsequenz des GfbI-Proteins ergaben, dass sich zwar an die Fibronectinbindungs-Region (Fibronectin bindende Repeats und Spacer I), wie beim SfbI-Protein eine prolinreiche Domäne anschließt. Diese besteht jedoch nur aus drei, statt wie im SfbI-Protein (Stamm A20; Talay *et al.*, 1992) aus vier Repeats. Im GfbA-Protein des Stammes ATCC1750 (Kline *et al.*, 1996) besteht diese Region ebenfalls aus drei prolinreichen Repeats. Denkbar wäre auch, dass die N-terminal gelegene, variable Region einen Einfluß auf die unterschiedlichen Invasionsmechanismen haben könnte. Diese Region beträgt ungefähr ein Drittel des gesamten Proteins, beginnt nach der Sequenz für das Signalpeptid und ist in den untersuchten Proteinen GfbA, SfbI und GfbI sehr heterogen. Die maximale Homologie beträgt 66.6 % zwischen SfbI und GfbI und 58.6 % zwischen GfbI und GfbA. (s.3.1.4./Abb.6). Auffällig ist hierbei, dass die Heterogenität sich nach der Sequenz für das Signalpeptid beginnend, bis über die ersten zwei prolinreichen Repeats erstreckt. Erst ab dem dritten Repeat zeigte sich eine sehr hohe, abrupt beginnende Homologie über die gesamte verbleibende Proteinsequenz.

Diese Unterschiede, vor allem in den Prolin-Repeats, welche für den Invasionsmechanismus und den Verbleib der Bakterien in der Zelle so entscheidend sind (Talay *et al.*, unpubliziert; Schwarz-Linek *et al.*, 2004), könnten der Grund für das unterschiedliche Invasionsverhalten der einzelnen Stämme sein.

Berücksichtigt werden sollte aber auch das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Oberflächenproteine während der Adhäsion und Invasion (Courtney *et al.*, 2002). Das Zusammenwirken erklärt, warum trotz gleicher Bindungsmotive unterschiedliche Invasionswege herausgebildet werden. Im Falle des Isolates A40 bewirkt die Fibronectin abhängige Bindung an die  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine die Aufnahme in Caveosomen nach vorheriger Aggregation von Caveolae. Im Gegensatz dazu erfolgt die Aufnahme eines M1-positiven Stammes 90-226 (Dombek *et al.*, 1999) über dieselbe Fibronectin vermittelte Bindung an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine durch eine reißverschlußartigen Verschmelzung von Filopodien (zipper-like-Mechanismus). Derselbe Mechanismus ist auch vom GAS-Isolat A8 bekannt. Allerdings exprimiert dieses Isolat kein SfbI-Homolog, bindet weder an Fibronectin noch an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine und wird dennoch wie der M1-positive Stamm über einen zipper-like-Mechanismus aufgenommen. Das rekombinante Protein aus dem *S. pyogenes*-Isolat A20 bewirkt Invaginationen (Rohde *et al.*, 2003), während der *S. gordonii*-Stamm SGO30, welcher dieses rekombinante Protein auf seiner Oberfläche exprimiert, sowohl über Membranfaltungen, als auch über Caveosomen in Epithelzellen invadiert (Talay, unpubliziert). Dabei waren nach 45 Min. Membranfaltungen zu detektieren und erst danach kam es zu den Membraneinstülpungen. Dies macht deutlich, dass nicht nur ein Oberflächen-Faktor ein Wirkungsprinzip festlegt, sondern die Summe der Interaktionen Bakterienoberfläche/Wirtszelle über den Invasionsmechanismus entscheidet.

Kline *et al.* (1996) bewiesen, dass nur 36 % der untersuchten, adhärenen GGS-Stämme ein GfbA-Homolog aufwiesen. Dies bedeutet, dass es noch weitere Oberflächenproteine der GGS gibt, welche eine Adhäsion an Wirtszellen vermitteln. Die Wechselwirkungen, bzw. das Zusammenspiel der Bindungsproteine während einer Infektion und der Anteil des Fibronectin bindenden Proteins an der Adhäsion wurden bisher nicht berücksichtigt. Um dies zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine GfbI-knock-out Mutante generiert. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem Ausschalten des Genes *gfbI* die Fähigkeit zur Fibronectinbindung bei der Mutante verloren ging. Dies zeichnet das Protein GfbI auf der Bakterienoberfläche als einziges Fibronectin bindendes Protein des Isolates G59 aus (s.3.4.1.). Das Bindungsverhalten der Mutante gegenüber den ECM- und Plasmaproteinen Fibrinogen, Kollagen, Laminin, Plasminogen,  $\alpha_2$ -Makroglobulin war unverändert. Diese Proteine wurden genauso stark gebunden, wie auch beim Wildtyp (s.3.4.2.). Hieraus lässt sich ableiten, dass dem Protein GfbI keine zusätzliche Funktion bei der direkten Bindung dieser ECM-Proteine zukommt. Es lässt sich jedoch anhand der durchgeführten Versuche keine Aussage darüber treffen, inwieweit die Proteine eventuell kooperativ über eine vorangegangene Bindung des Fibronectins rekrutiert würden. Dinkla *et al.* (2003) konnten bei GAS zeigen, dass Kollagen über die Bindung der Streptokokken an Fibronectin rekrutiert wurde. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch bei der Fibronectinbindung des G59-Isolates möglich. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang, GfbI auf seine Bindungsfähigkeit zu weiteren Proteinen der primären Besiedelungsgewebe hin zu untersuchen. Falls es über die in dieser Arbeit untersuchten Proteine hinaus ein Protein gibt, welches direkt über GfbI gebunden werden könnte, müsste dies im Unterschied von Wildtyp zu Mutante klar zu definieren sein. Auch könnten Versuche zur Rekrutierung weiterer Proteinen über das zuvor gebundene Fibronectin Aufschluß darüber geben, welches dieser ECM-Proteine letztendlich für die Adhäsion verantwortlich ist.

Fibronectin kommt überwiegend im Gewebe und der Schleimhaut des oberen Respirationstraktes, Fibrinogen und  $\alpha_2$ -Makroglobulin in Wunden und im Blut vor. Die hohe Bindung sowohl des Wildtyps, als auch der Mutante an diese Proteine (s.3.4.2.) gibt einen Hinweis auf die Fähigkeit zur Kolonisierung dieser Wirtsregionen und einen wahrscheinlichen Verbreitungsweg über das Blut.

Ähnlich wie SfbI bei GAS könnte auch GfbI der GGS einen sogenannten „clumping“-Faktor darstellen. Die in dieser Arbeit verwendeten über-Nacht-Kulturen von Wildtyp und Mutante zeigten deutlich unterschiedliches Wachstumsverhalten. Während die Mutante eine homogene Trübung im gesamten Wachstumsröhrchen aufwies, bildete sich beim Wildtyp ein Pellet am Boden des Röhrchens und der Überstand war klar. Durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen konnte dies verifiziert werden, da der Wildtyp wesentlich stärker aggregiert auf den HEp-2-Zellen adhärierte, als dies bei der Mutante der Fall war (s.3.4.5.). GfbI ist demnach ein wichtiges Oberflächenprotein, um die Bakterien stärker zu akkumulieren und damit die gleichzeitige Adhäsion vieler Bakterien an Epithelzellen zu ermöglichen. Desweiteren

könnte die Aggregation der einzelnen Bakterien zu großen Bakterienhaufen auch dazu dienen, eine Vergrößerung der Kolonie-Oberfläche herbeizuführen. Dadurch könnten Oberflächen-Antigenen der im Inneren dieser Aggregate gelegenen Streptokokken maskiert werden und diese Streptokokken wären besser vor den Abwehrzellen des Wirtes geschützt. Dies hätte den Vorteil, dass die Streptokokken vor einem Angriff des Wirtseigenen Immunsystems und vor Phagocytose besser geschützt würden, wie es für GAS gezeigt werden konnte (Frick *et al.*, 2000).

Die in dieser Arbeit angefertigten Untersuchungen zum Potential des Proteins GfbI für die Virulenz ergaben, dass die Adhäsion der Mutante um 50 %, die Invasion im Vergleich zum Wildtyp um 63% reduziert war (s.3.4.3.). Dies zeigt die Wichtigkeit dieses Proteins für die Adhäsion, und mehr noch für die Invasion. Dennoch war die Mutante in der Lage, an die verwendeten HEp-2-Zellen zu adhären und diese zu invadieren. Doppelimmunfluoreszenz-Versuche haben den Effekt deutlich bestätigt (s.3.4.4.). Dies spricht dafür, dass es auf der Oberfläche der Bakterien noch einen weiteren Faktor für die Adhäsion und einen weiteren Mechanismus für die Invasion gibt. Dies haben rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Infektion von HEp-2-Zellen bewiesen (s.3.4.4.). Beim Wildtyp G59 konnten bei der Invasion sowohl Membranfaltungen beobachtet werden, als auch ein Einsinken der Bakterien mit einem zipper-artigen Übergreifen von Filopodien. Das Auftreten der Membranfaltungen bestätigt die Ergebnisse aus dem Versuch mit den GfbI-gekoppelten Latex-Beads. Bei der Mutante TF59 hingegen konnten keine Membranfaltungen beobachtet werden. Hier erfolgte die Invasion ausschließlich über den Zipper-like-Mechanismus bei gleichzeitigem Einsinken der Bakterien in die Membran. Beide Mechanismen scheinen demnach gleichzeitig und unabhängig voneinander abzulaufen. Membraneinstülpungen wie beim GAS-Isolat A40, konnten zu keinem Zeitpunkt detektiert werden.

Wie in den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, befinden sich sowohl der Wildtyp, als auch die Mutante nach der Invasion in membranumschlossenen Organellen (s.3.4.6.). Die Bakterien befinden sich in zum Teil sehr großen Organellen, deren Membranen nicht mit allen darin befindlichen Bakterien in Kontakt kommen. Darüber hinaus konnten Bakterien detektiert werden, die in engen Kontakt mit der Organellmembran zu liegen kamen und von dieser eng umschlossen waren. Für die Mutante waren solche Organellen nur selten zu beobachten. Mögliche Ursache könnte der Zeitfaktor sein, d.h. dass die Organellstruktur sich im Laufe der Zeitpunkte verändern und nicht zwangsläufig auf unterschiedliche Organellarten bei Eintritt in die Zelle zurückzuführen sind. Organellen mit Zelltrümmern zeugten davon, dass sowohl der Wildtyp, als auch die Mutante nach einem Zeitraum von 6h-8h verdaut wurden. Ihre Zahl dezimierte sich deutlich nach 24h.

Rohde *et al.* (2003) konnten zeigen, dass das *S. pyogenes* Isolat A40, welches über eine Fibronectin vermittelte Invasion unter Beteiligung der  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine in die Epithelzellen invadiert, in Caveosomen lokalisiert wurde. Nach 24h befand sich jedoch

auch ein Großteil der aufgenommenen Streptokokken im Cytoplasma. Molinari *et al.*, (2000) konnten zeigen, dass das Isolat A8 hingegen, welches ohne Beteiligung der  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine, aber unter Beteiligung von Filopodien die Zellen invadierte, ebenfalls aus den gebildeten Vakuolen in das Cytoplasma freigesetzt wurde und dort zur Vermehrung fähig war.

Es konnte gezeigt werden, dass die Invasion von Zellen und die Replikation der Bakterien in diesen eine Art Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes, aber auch vor Antibiotika darstellt (Österlund *et al.*, 1997). Der von Dombek *et al.* (1999) beschriebene M1 positive GAS-Stamm, welcher unter Beteiligung von Aktinpolymerisation endocytotisch aufgenommen wurde, befand sich in Vakuolen, in deren Membranen ein lysosomales Membranglycoprotein (Lamp-1) detektiert werden konnte.

Zellen, welche mit Salmonella infiziert wurden, zeigten sogar zwei verschiedene Vakuolenarten zur gleichen Zeit in einer Zelle. Eine Vakuolenart ist mit Lamp-1, dem lysosomalen Marker, assoziiert, die zweite mit polymerisiertem Aktin (Finlay *et al.*, 1995). Trotz ähnlichem Rezeptor und ähnlicher Invasionsmechanismen ist der Verbleib der Bakterien innerhalb der Zelle trotzdem sehr unterschiedlich.

In den Kolokalisationsexperimenten (3.4.8.) zeigte sich, dass sich die intrazellulären Gruppe G Streptokokken in Vakuolen befanden, die durch den Lamp-1-Marker eindeutig als lysosomale Organellen eines klassischen Endocytoseweges detektiert wurden.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Streptokokken, wie schon in den transmissionselektronenmikroskopischen Analysen gezeigt wurde, innerhalb dieser Vakuolen zum größten Teil verdaut werden. Das GfbI-Protein entspricht zwar einem Homolog zum SfbI-Protein, jedoch zeigen sich auch hier wieder die Unterschiede, denn der invasive *S. pyogenes* A40-Stamm wurde nicht in Lysosomen detektiert (Rohde *et al.*, 2003). Auch hier liegt wiederum die Vermutung nahe, dass der Unterschied in einer unterschiedlichen Proteinstruktur des Isolates A40 im Vergleich zum Wildtyp zu suchen ist. Die Mutante konnte ebenso wie der Wildtyp in Lysosomen detektiert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass für diesen Prozess nicht das Protein GfbI verantwortlich ist, sondern wiederum weitere, unbekannte Faktoren, die zu derart unterschiedlichem Adhäsions- und Invasionsverhalten führen.

Caveolin-1 ist in den Membranen der durch das A40-Isolat verursachten Caveosomen zu finden, während Transferrin als Eisen-Transport-Protein über eine klassische, rezeptorvermittelte Endocytose in die Epithelzellen aufgenommen wird. Eine Kolokalisation der Streptokokken mit Caveolin-1 und Transferrin wurde nicht beobachtet. Eine Kolokalisation hätte bedeutet, dass sich die invadierten Streptokokken in Caveosomen (Caveolin-1), bzw. frühen Endosomen (Transferrin) befunden hätten, dies war nicht der Fall.

Ein horizontaler Gentransfer ist für die Mehrheit der Virulenzfaktoren von GAS und GGS beschrieben worden (s.1.4. und 4.Diskussion/Seite2). Dabei muss man davon ausgehen, dass ein horizontaler Gentransfer niemals zielgerichtet verläuft. Dieser erfolgt ungerichtet und erst, wenn sich für die Streptokokken bei der Kolonisierung des

Wirtes ein Überlebensvorteil ergibt, wird dieser Gentransfer durch den Vorteil in der Selektion dieser Streptokokken etabliert. Geht man davon aus, dass Gruppe G Streptokokken das GfbI Protein über einen horizontalen Gentransfer von den GAS erhalten haben könnten, so muss man bedenken, dass die Invasion von Epithelzellen vermutlich nicht zu den übertragenen Vorteilen gehören könnten. Trotzdem ist im Fall des Fibronectin bindenden Proteins ein horizontaler Gentransfer aufgrund der Sequenzhomologien (3.1.3. und 3.1.4.) sehr wahrscheinlich. Legt man die Eigenschaften des homologen SfbI-Proteins zugrunde (s.1.5.), so könnte die Übertragung des Fibronectin bindenden Proteins GfbI den GGS Vorteile bei der Adhäsion, der Kolonisierung des Wirtsgewebes, der Verbreitung im Wirt und auch bei der Umgehung des wirtseigenen Immunsystems gebracht haben. Die Vorteile der Adhäsion und Invasion konnten in dieser Arbeit gezeigt werden (s. 3.2.2./3. und 3.4.1./2./3./7.) Durch das Fibronectin bindende Protein sind GAS zusätzlich in der Lage, weitere Wirtsproteine über die Bindung von Fibronectin zu rekrutieren und damit die Vorteile dieser Proteine zu nutzen. Fibronectin bindet neben Kollagen (Hahn und Xanada, 1979) auch an IgG (Rostagno *et al.*, 2001), Plasminogen (Moser *et al.*, 1993) und Fibrinogen (Hynes *et al.*, 1990). Für *S. pyogenes*-Isolate des Serotyps M3 und M18, welche über die Fibronectinbindung in der Lage sind, Kollagen zu rekrutieren, ist eine Transmigration durch Endothelzellen beschrieben worden (Talay, unpubliziert). Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden ausschließlich mit Epithelzellen durchgeführt. Es wäre sicher interessant, die Überlebensfähigkeit der Bakterien nach der Invasion in verschiedenen Gewebezelllinien zu untersuchen, um Aufschluß über die Hauptverbreitung und eine mögliche Überlebensfähigkeit der Streptokokken in bestimmten Zelltypen zu erlangen.

Inwieweit zusätzliche ECM-Proteine über die Bindung von Fibronectin rekrutiert werden und eine Rolle bei der Infektion spielen könnten, lässt sich anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht belegen. Doch könnte die zusätzliche Rekrutierung verschiedener ECM-Proteine über Fibronectin wie bei den GAS auch für die GGS einen weiteren Vorteil bedeuten, z.B. einen Schutz vor Phagocytose.

In dieser Arbeit wurden in Inhibierungsstudien verschiedene Faktoren und Rezeptoren beeinflusst, um weitere Faktoren für die unterschiedlichen Invasionswege von Wildtyp und Mutante zu finden. Die Bindung von Fibronectin an  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine humaner Epithelzellen wurde durch die Verwendung eines RGD-Peptides blockiert (3.4.7.1.). Sowohl die Adhäsion, als auch die Invasion von Wildtyp und Mutante blieben im Vergleich zum Kontrollstamm A40 (SfbI+) unbeeinflusst. Dies zeigt, dass  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine bei der Adhäsion und bei keinem der beiden beobachteten Invasionswege eine Rolle spielen. Das legt die Vermutung nahe, dass die direkte Bindung an Fibronectin eventuell nicht der entscheidende Faktor ist, welcher die Adhäsion vermittelt. Denkbar wäre die Rekrutierung eines weiteren, bislang unbekannten Proteins über die Fibronectinbindung des GfbI, welches dann die Integrin unabhängige Adhäsion, bzw. Invasion vermitteln könnte. Dies würden auch die Ergebnisse aus dem Versuch, in dem das GfbI Protein durch Antikörper blockiert wurde und sich trotzdem keine Reduzierung der Adhäsion ergab, bestätigen. Eine Vorinkubation der Bakterien

mit einem GfbI-spezifischen Antikörper (3.4.7.2.) reduzierte die Adhäsion von Wildtyp und Mutante nur leicht. Allerdings wurde das Invasionspotential des Wildtyps auf das Niveau der Mutante reduziert (3.4.7.1./Punkt2.). Dies zeigte zum einen, dass die Antikörper funktional waren, an das GfbI-Protein gebunden und dieses vollständig blockiert haben. Dadurch wird desweiteren deutlich, dass GfbI ein wichtiges Invasin darstellt. Das Adhäsionspotential des Wildtyps wurde nicht in gleichem Maße reduziert wie das Invasionspotential. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass GfbI zwar als Adhäsion zur Adhäsion beiträgt, dies jedoch nicht wirklich entscheidend für den ersten Schritt der Kolonisierung ist. Hierfür könnte ein weiteres, unbekanntes Oberflächenprotein verantwortlich sein. Sowohl die Adhäsion, als auch die Invasion der Mutante wurden leicht reduziert, obwohl die verwendeten Antikörper auf der Mutante kein Epitop hätten detektieren können. Ein Grund hierfür könnte sein, dass Immunglobuline von Gruppe G Streptokokken generell stark unspezifisch gebunden werden, z.B. unter anderem vom Protein G. Die unspezifische Bindung an Streptokokken kann sowohl über den Fc-Teil geschehen, als auch über die konstanten Regionen der schweren Kette in den F(ab)-Fragmenten (Malke *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2000; Schalen *et al.*, 1983; Raeder *et al.*, 1998). Es könnte also aufgrund dieser unspezifischen Bindungen zu sterischen Behinderungen auf der Oberfläche der Streptokokken kommen. Dies gilt für die bislang nicht bekannten Oberflächenproteine, die zu der Adhäsion und Invasion der Mutante beitragen, als auch für das Protein GfbI im Fall des Wildtyp-Isolates G59.

Die unspezifische Bindung von Kaninchen-IgGs an den Wildtyp und an die Mutante wurde im Rahmen der Versuche in dieser Arbeit überprüft und bestätigt. Bei beiden zeigte sich in gleichem Maße eine leicht reduzierte Adhäsion und Invasion.

Denkbar wäre darüber hinaus, dass nach der Antikörperinkubation ein unbekanntes ECM-Protein an die verbleibenden freien, spezifischen Epitope des GfbI bindet, bzw. selbst kleinste Mengen gebundenes Fibronectin dieses Protein in ausreichendem Maße rekrutiert, und es somit in der Lage ist, eine unveränderte Adhäsion zu realisieren. GfbI könnte dabei eine wenn auch untergeordnete, aber dennoch synergistische Rolle spielen.

Durch die Entfernung des Cholesterols aus der Zellmembran der Epithelzellen mittels Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin konnte die Adhäsion und die Invasion sowohl von Wildtyp als auch der Mutante inhibiert werden. Allein der Wildtyp zeigte noch ein verbleibendes Adhäsionspotential. Dadurch wird deutlich, wie wichtig die Fluidität der Zellmembran für die Ausbildung der Filopodien ist. Und wie entscheidend diese Strukturen für die Adhäsion und auch die Invasion der Streptokokken sind. Möglich ist auch, dass durch die veränderte Membranbeschaffenheit Rezeptoren nicht mehr frei in der Membran diffundieren können. Dadurch wäre ein für die Invasion notwendiges Clustering der Rezeptoren ausgeschlossen, wie es für die SfbI-vermittelte Invasion beschrieben wurde (Rohde *et al.*, 2003). Rohde *et al.* konnten auch zeigen, dass abhängig von der Konzentration des Methyl- $\beta$ -Cyclodextrins die Invasion des Isolates A40 inhibiert wurde. Es ist vorstellbar, dass nicht nur die für die Invasion des A40-Isolates essentiellen  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine in ihrer Bewegung durch die Zellmembran beeinträchtigt werden, sondern auch die bislang unbekannten Rezeptoren, die für die Virulenz der

GGs von Bedeutung sind. Die Invasion von Wildtyp G59 und Mutante TF59 ist bei beiden Invasionsmechanismen stark von der Ausbildung von Filopodien, bzw. von einer Umorganisation der Zellmembran abhängig. Die fehlende Fluidität der Zellmembran inhibiert jegliche Membranausstülpungen und somit jegliche Invasion.

Durch die Inhibierung des Mikrotubulsystems (durch Nocodazol) und des Aktinfilamentsystems (durch Cytochalasin D) wird die Bedeutung der Aktinfilamente für die Invasion, aber auch schon für die Adhäsion deutlich (s.3.4.7.3.). Während die Adhäsion bei der Mutante vollständig inhibiert war, zeigte sich beim Wildtyp dagegen nur eine Reduktion. Dies spricht dafür, dass bei der Mutante bereits bestehende Membranausstülpungen, bzw. ein stabiles Aktinfilamentsystem für eine Adhäsion von Vorteil, wenn nicht sogar unabdingbar sind. Die verbleibende Fähigkeit zur Adhäsion beim Wildtyp könnte auf das untersuchte Protein GfbI zurückzuführen sein. Die Invasion ist bei beiden Stämmen hingegen vollständig inhibiert. Dies bestätigt vorherige Ergebnisse, dass für einen erfolgreichen Invasionsweg eine Umorganisation der Zellmembran in Form von Filopodien und Membranfaltungen unabdingbar ist.

Bei der Verwendung eines Src-Kinase-Inhibitors (Src-PP2) wird deutlich, welchen Einfluss sogenannte capping-Strukturen auf die Adhäsion der Streptokokken haben (3.4.7.3./6.). Nach 15 Min Vorinkubation von HEp-2-Zellen mit diesem Inhibitor war sowohl die Adhäsion als auch die Invasion von Wildtyp und Mutante inhibiert. Eine unbeschadete Zellmorphologie wurde mittels einer Phalloidin-Färbung des Aktinskelettes in der Doppelimmunfluoreszenz überprüft. Dabei wiesen die Zellen ihre ursprüngliche Zellmorphologie auf.

Offensichtlich ist nicht nur die Umorganisation bereits bestehender Aktinfilamente von Bedeutung für den Adhäsions- und Invasionsprozess (siehe Inhibierungsstudien mit Nocodazol und Cytochalasin D), sondern auch die Verankerung der Aktinfilamente in der Zellmembran für die Adhäsion.

Sind diese Verankerungspunkte (focal contacts) als Folge einer inhibierten Src-Kinase gestört oder nicht vorhanden, unterbleibt auch die Adhäsion, trotz funktionaler, aber unverankerter Aktinfilamente innerhalb der Zelle. Diese könnten selbst bei einem externen Signal keine Filopodien, oder Membranfalten bilden, da sie nicht mehr an der Zellmembran verankert werden könnten. Dies wäre ein Grund für die inhibierte Invasion sowohl von Wildtyp, als auch der Mutante, sofern das reduzierte Invasionspotential nicht nur auf die fehlende Adhäsion zurückzuführen ist. Ein ähnlicher Einfluß der focal contacts wurde von Agerer *et al.* (2003) für *Staphylococcus aureus* beschrieben. *S. aureus* bindet über ein Fibronectin bindendes Protein (FnBPA, FnBPB) an Fibronectin und über  $\beta$ 1-Integrine an Epithelzellen. Die Invasion konnte beeinflusst werden, sobald eine Modifikation der focal contacts über eine veränderte Aktivität der Src-Kinase erfolgte, die Adhäsion wurde im Rahmen dieser Studien nicht untersucht.

Über die Integrine in den focal contacts bindet sich die Zelle an die extrazelluläre Matrix, nachdem die Anheftung der Aktinfilamente an die Zellmembran zur Kumulation der Integrine in den focal contacts führte. Dann erst kommt es zur

Bindung an die extrazelluläre Matrix. Das ECM-Protein Fibronectin liegt normalerweise in fibrillärer Form fest verankert im Gewebe vor. Nur die Bindung allein von Fibronectin und Integrinen führt *in vivo* nicht zu einer Aufnahme des Fibronectins in die Zelle, da dies nicht der eigentliche Zweck dieser Bindung ist, und  $\beta_1$ -Integrine keinen natürlichen endocytotischen Rezeptor darstellen (Alberts *et al.*, 1996). Vielmehr dient die Bindung dazu, die Zelle in der ECM zu verankern und auf Veränderungen der ECM mit einer Umorganisation des Aktinzytoskelettes zu reagieren. Dennoch scheinen die bereits bestehende Verankerungspunkte der Aktinfilamente für die Adhäsion der Gruppe G Streptokokken von Bedeutung zu sein. Die Reduktion der Adhäsion zeigt, dass die Streptokokken offenbar in Kontakt, bzw. in unmittelbare Nähe zu Proteinen treten könnten, die in den sogenannten capping-Strukturen vorkommen, bzw. als Transmembranproteine mit diesen capping-Strukturen zu interagieren scheinen.

Bei den Proteinen, bzw. den Rezeptoren, mit denen die Streptokokken in Kontakt treten, kann es sich daher nicht um  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine handeln. Integrine befinden sich bereits verteilt in der Zellmembran, bevor sie durch die gebündelte Anheftung von Aktinfilamenten in den capping-Strukturen der focal contacts kumuliert werden ((A)Alberts *et al.*, 1996). Wäre eine Interaktion mit  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen direkt über die Fibronectinbindung der Fall, wäre eine über die Zellmembran verteilte Adhäsion in diesem Versuch durchaus möglich. Nur die Invasion wäre durch fehlende Aktinverankerung inhibiert.

Damit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Gruppe G Streptokokken über ein Fibronectin bindendes Protein verfügen, welches sowohl an der Adhäsion, als auch an der Invasion der Bakterien beteiligt ist. Es bewirkt sogenannte Membranfaltungen der Epithelzellmembran, die zur Invasion führen. Entscheidend dafür ist die Beteiligung des Aktinfilamentsystems.

Es wurde deutlich, dass trotz eines homologen Proteins (SfbI und GfbI) der Adhäsions- und Invasionsmechanismus der Gruppe G Streptokokken völlig anders abläuft, als der der Gruppe A Streptokokken. Unklar bleibt, warum ein homologes Protein zu derart unterschiedlichen Adhäsions- und Invasionsmechanismen führt. Es wird daher vermutet, dass es weitere Oberflächenproteine sowohl auf der Bakterienoberfläche, als auch auf der Wirtsmembran gibt, die nicht allein durch ihr Vorhandensein, sondern auch durch ein Wechselspiel miteinander über die Adhäsion und den Invasionsmechanismus entscheiden. Desweiteren muss bedacht werden, dass ein horizontaler Gentransfer niemals zielgerichtet abläuft. Der Vorteil dieses übernommenen Fibronectin bindenden Proteins kann durchaus als kooperative Unterstützung in der primären Adhäsion, in der Invasion, in der Vermeidung der Phagozytose und der Beeinflussung des Immunsystems liegen, wie es für SfbI bei *S. pyogenes* beschrieben wurde. Eine Invasion in die Wirtszelle kann im Falle der verwendeten Epithelzellen nicht dem Schutz dienen, könnte jedoch in anderen Zellen ohne einen Verdau in den Lysosomen durchaus zum Überleben der Streptokokken



beitragen. Insofern wären weitere Untersuchungen der beteiligten Faktoren und der Einfluss auf das Immunsystem des Wirtes sehr aufschlussreich für das Infektionspotential des Proteins GfbI der Gruppe G Streptokokken.

### **Ausblick**

Die Ursachen und Zusammenhänge für die unterschiedlichen Invasionswege trotz ähnlicher Proteine, Rezeptoren und Invasionsmorphologien, welche die Streptokokken in unterschiedliche Organellen leiten, sind nicht geklärt. Weitere Untersuchungen zu den verantwortlichen Faktoren, Proteinen und Rezeptoren könnten Aufschluss über die Relevanz und Bedeutung dieser verschiedenen Möglichkeiten und deren Zusammenspiel während einer Infektion geben.

Es wäre interessant, über Bindungsstudien weitere Wirtsproteine zu detektieren, welche durch ihre direkte Bindung, oder indirekte Bindung, zum Infektionsverhalten des GGS-Isolates G59 beitragen. Durch Kenntnis dieser Proteine könnte auch Aufschluß über die Adhäsionsrezeptoren gewonnen werden. Diese Erkenntnisse könnten auch dazu beitragen, die vom A40 und A20 Stamm abweichenden Invasionsmorphologien zu verstehen. Bei allen Versuchen könnten durch die Existenz und den Vergleich mit der Mutante Erkenntnisse über die Relevanz des Proteins GfbI für den Adhäsions- und Invasionsprozess gewonnen werden.

Die Inhibierungsstudien dieser Arbeit bewiesen, dass für eine erfolgreiche Adhäsion und Invasion, sowohl des Isolates G59, als auch der Mutante, ein stabiles, ausgebildetes Aktinfilamentsystem von entscheidender Bedeutung ist. Weitere Inhibierungs-Studien könnten Aufschluß über die Beteiligung eventuell anderer Integrine der  $\beta_1$ -Familie liefern.

Im Hinblick auf die Überlebensstrategie der Streptokokken in der Zelle könnten Versuche mit verschiedenen Zelllinien Aufschluß über die Verbreitung der Streptokokken im Wirt liefern. Zusätzlich könnte damit auch untersucht werden, welche Bedeutung das Protein GfbI als Invasin für GGS hat, oder ob die Streptokokken eher von den weiteren Selektionsvorteilen des GfbI Proteins profitieren. Diesbezüglich wären Untersuchungen und der Vergleich Wildtyp und Mutante im Tiermodell sehr interessant.

## 5. Literaturverzeichnis

**Agerer, F.; Michels, A.; Ohlsen, K.; Hauck, C.R.** (2003) Integrin-mediated Invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family Protein-tyrosine Kinases. *The J. .B. Chem.* **278**(43):42524-42531

**(A) Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D.** (1996) Molecular biology of the cell. *Garland Publishing, INC. N.Y. & London.* **3**:841-843, 997

**(B) Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D.** (1996) Molecular biology of the cell. *Garland Publishing, INC. N.Y. & London.* **3**:996-998

**Artiushin, S.C.; Timoney, J.F.; Sheoran, A.S.; Muthupalani, S.K.** (2002) Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of *Streptococcus equi*. *Microb. Pathogen.* **32**:71-85

**Bajaj, S.P.; Castellino, J.** (1977) Activation of human plasminogen by equimolar levels of streptokinase. *J. Biol. Chem.* **25**:492-498

**Balke, E.; Weiss, R.; Seipp, A.** (1985) Hyaluronidase activity of  $\beta$ -hemolytic streptococci of Lancefield group C. *Zentralblatt Bakteriol. und Hyg.* **21**:524-526

**Ben Nasr, A.; Wisted, A.; Ringdahl, U.; Sjobring, U.** (1994) Streptokinase activates plasminogen bound to human group C and G streptococci through M-like proteins. *Eur. J. Biochem.* **222**:267-276

**Benchetrit, L.C.; Gray, E.D.; Edstrom, R.D.; Wannamaker, L.W.** (1978) Purification and characterization of a hyaluronidase associated with a temperate bacteriophage of group A type 49 streptococci. *J. Bacteriol.* **134**:221-228

**Billington, S.J.; Jost, B.H.; Songer, J.G.** (2000) Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**:197-205

**Bisno, A.L.; Gaviria, J.M.** (1979) Murine model of recurrent group G streptococcal cellulites: no evidence of protective immunity. *Infect. Imm.* **65**(12):4926-4930

**Caparon, M.G.; Geist, R.T.; Perez-Casal, J.; Scott, J.R.** (1992) Environmental regulation of virulence in group A streptococci: transcription of the gene encoding M protein is stimulated by carbon dioxide. *J. Bacteriol.* **174** (17):5693-5701

**Casadevall, A.; Freundlich, L.F.; Pirofski, L.** (1992) Acute glomerulonephritis and encephalomyelitis following group G streptococcal bacteremia. *Clin. Infec. Dis.* **14**:784-786

**Chhatwal, G.S.; Blobel, H.** (1986) Binding of human fibrinogen to streptococci and its role in streptococcal pathogenicity. In D. Lane, A.Henschen, and K. Jasani (ed), *Fibrinogen, Fibrin Formation and fibrinolysis*, Walter de Gruyter and Co., Berlin, Germany. P. 239-249

- Chhatwal, G.S.; Dutra, I.S.; Blobel, H.** (1985) Fibrinogen binding inhibits the fixation of the third component of human complement on surface of groups A,B,C, and G streptococci. *Microbiol. Immunol.* **29**:973-980
- Chhatwal, G.S.; Preissner, K.T.; Müller-Berghaus, G.; Blobel, H.** (1987) Specific binding of the human S protein (vitronectin) to streptococci, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**:1878-1883
- Chhatwal, G.S.; Talay, S.** (2000) Pathogenity factors in group C and G streptococci. *Gram positiv pathogens, ed by V. A. Fischetti et al.. American Society for Microbiology, Washington D.C.* **17**:177-183
- Cleary, P.P., Peterson, J., Chen, C., Nelson, C.** (1991) Virulent human strains of group G streptococci express C5a-Peptidase enzyme similar to that produced by group A streptococci. *Infect. Imm.* **59**:2305-2310
- Collins, C.M., Kimura, A.; Bisno, A.** (1992) Group G streptococcal M protein exhibits structural features analogous to those of class I M protein of group A streptococci. *Infect. Immun.* **60**:3689-3696
- Courtney, H.S.; Hasty, D.L.; Dale, J.B.** (2002) Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann. Med.* **34**:77-87
- Cunningham, M.W.** (2000) Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical Microbiol. Rev.* **13**(3):470-511
- Devriese, L.A.; Hommez, J.; Kilpper-Balz, R. ; Schleifer, K.H. ;** (1986) *Streptococcus canis* sp. nov.: a species of group G streptococci from animals. *Int. J. system. Bacteriol.* **36**: 422-425
- Dinkla, K.; Rohde, M.; Jansen, W.T.M.; Carapetis, J.R.; Chhatwal, G.S.; Talay, S.R.** (2003) *Streptococcus pyogenes* recruits collagen via surface bound fibronectin: a novel colonisation and immune evasion mechanism. *Mol. Microbiol.* **47**:861-869
- Dombek, P.E.; Cue, D.; Sedgewick, J.; Lam, H.; Ruschkowski, S.; Finlay, B.B.; Cleary, P.** (1999) High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediates invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol. Microbiol.* **31**(3):859-870
- Efstratiou, A.** (1997) Pyogenic streptococci of Lancefield groups C and G as pathogens in man. *J. applied Microbiol. Symposium Supplement.* **83**:72-79
- Erntell, M.; Myhre, F.B.; Kronvall, G.** (1985). Non-immune IgG F(ab')<sub>2</sub> binding to group C and G streptococci is mediated by structures on gamma chains. *Scand. J. Immunol.* **21**(2):151-1577
- Filippsen, L.F.; Valentin-Weigand, P.; Blobel, H.; Preissner, K.T.; Chhatwal, G.S.** (1990) Role of complement S protein (vitronectin) in adherence of *Streptococcus dysgalactiae* to bovine epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.* **51**:861-865
- Fischetti, V.A.** (1989) Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clinic. Microbiol. Rev.* **2**:285-314

- Fischetti, V.A.; Horstmann, R.D.; Pancholi, V.** (1995) Location of the complement factor H binding site on streptococcal M-Protein. *Infect. Immun.* **63**:149-156
- Fluckiger, U.; Jones, K.F.; Fischetti, V.A.** (1998) Immunoglobulins to group A streptococcal surface molecules decrease adherence to and invasion of human pharyngeal cells. *Infect. Immun.* **66**(3):974-979
- Franken, C.; Haase, G.; Brandt, C.; Weber-Heynemann, J.; Martin, S.; Lammler, L.; Podbielski, A.; Luttkien, R.; Spellerberg, B.** (2001) Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. *Mol. Microbiol.* **41**:925-935
- Gase, K.; Gase, A.; Schirmer, H.; Malke, H.** (1996) Cloning, sequencing and functional overexpression of the *Streptococcus equisimilis* H46A gapC gene encoding glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase that also functions as a plasmin(ogen)-binding protein. Purification and biochemical characterization of the protein. *Eur. J. Biochem.* **239**:42-51
- Gnann, J.W.; Gray, B.M.(jr.); Griffin, F.M (jr.); Dismukes, W.E.** (1987) Acute glomerulonephritis following group G streptococcal infection. *J. Infect. Dis.* **156**:411-412
- Guzman, CA.; Talay, S.R.; Molinari, G.; Medina, E.; Chhatwal, G.S.** (1999) Protective immune response against *Streptococcus pyogenes* in mice after intranasal vaccination with fibronectin-binding protein SfbI. *J. Infect. Dis.* **179**:901-906
- Hahn, L. ; Xanada, K.** (1979) Identification and isolation of a collagen-binding fragment of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:6172-6176
- Haidan, A.; Talay, S.; Rohde, M.; Sriprakash, S.; Currie, B.J.; Chhatwal, G.S.** (2000) Pharyngeal carriage of group C and group G streptococci and acute rheumatic fever in an aboriginal population. *The Lancet.* **365**:1167-1169
- Hanski, E.; Caparon, M.G.** (1992) Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus – *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:6172-6176
- Hirose, Y.; Yagi, K.; Honda, H.; Shibuya, H.; Okzaki, E.** ( 1997) Toxic shock-like syndrome caused by non-group A  $\beta$ -hemolytic streptococci. *Emergency and critical care medical center, Japan, Arch. Intern Med.* **157**:1891-1894
- Holm, S.E.** (1988) The pathogenesis of acute post-streptococcal glomerulonephritis in new lights. *Acta Patho., Microbiol. et Immunol. Scandinavica.* **96**:189-193
- Horstmann, R.D.; Sievertsen, H.J.; Leippe, M.; Fischetti, V.A.** (1992) Role of fibrinogen in complement inhibition by streptococcal M-protein. *Infect. Immun.* **60**:5036-5041

- Jaffe, J.; Natason-Yaron, J.; Caparon, M.G.; Hanski, E.** (1996) Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *S. pyogenes*, possesses two binding domains. *Mol. Microbiol.* **21**:373-384
- Jansen, T.; Janssen, M.; Jong, A.** (1998) Reactive arthritis associated with Group C and G  $\beta$ -hemolytic streptococci. *J. Rheumatol.* **26** (6):1126-1130
- Kalia, A.; Bessen, D.E.** (2003) Presence of streptococcal pyrogenic exotoxin A and C genes in human isolates of group G streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**:291-295
- Kalia, A.; Enright, M.C.; Spratt, B.G.; Bessen, D.E.** (2001) Directional gene movement from human pathogenic to commensal-like streptococci. *Infect. Immun.* **69**(8):4858-4869
- Kaur, S.; Kumar, D.; Grover, A.; Khaduja, K.L.; Kaplan, E.L.; Gray, E.D.** (1998) Ethnic differences in expression of susceptibility marker(s) in rheumatic fever/rheumatic heart disease patients. *Int. J. Cardiol.* **64**:9-14
- Kline, J.B.; Xu, S.; Bisno, A.L.; Collins, C.M.** (1996) Identification of a fibronectin-binding protein (GfbA) in pathogenic group G streptococci. *Infect. Immun.* **64**(6):2122-2129
- KoK, J.W.** (1992) Recycling pathways of glucosylceramide in BHK cells: distinct involvement of early and late endosomes. *J. Cell Science.* **103**:1139-1152
- Lannergard, J.; Frykberg, L.; Guss, B.** (2003) CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. *FEMS Microbiol. Lett.* **222**:69-74
- Lindgren, P.E.; McGavin, M.J.; Signäs, C.; Guss, B.; Gurusiddappa, S.; Höök, M.; Lindberg, M.** (1993) Two different genes coding for fibronectin-binding proteins from *S. dysgalactiae*. The complete nucleotide sequence and characterization of the binding domains. *Eur. J. Biochem.* **214**:819-827
- Lindgren, P.E.; Signäs, C.; Rantamäki, L.; Lindberg, M.** (1994) A fibronectin-binding protein from *S. equisimilis*: characterisation of the gene and identification of the binding domain. *Vet. Microbiol.* **41**:235-247
- Lindmark, H.; Jacobson, K.; Freyberg, L.; Guss, B.** (1996) Fibronectin-binding protein of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*. *Infect. Immun.* **64**:3993-3999
- Liu, CE.; Jang, TN.; Wang, FD.; Wang, LS.; Liu, CY.** (1995) Invasive Group G streptococcal infections: a review of 37 cases. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. **56**(3):173-178
- Malke, H.** (2000) Genetics and pathogenicity factors of group C and G streptococci. *Gram positive pathogens, ed by V.A. Fischetti et al., American Society for Microbiology, Washington D.C.* **16**:163-176
- Medina, E.; Molinari, G.; Rohde, M.; Haase, B.; Chhatwal, G.S.; Guzman, C.A.** (1999) Fc-mediated nonspecific binding between fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* and human immunoglobulins. *J. Immun.* **163**:3396-3402

- Medina, E.; Schulze, K.; Chhatwal, G.S.; Guzman, C.A.** (2000) Nonimmune interaction of the SfbI protein of *Streptococcus pyogenes* with the immunoglobulin G F(ab)<sub>2</sub>-fragment. *Infect. Immun.* **68**:4786-4788
- Mohan, P.K.; Shanmugam, J.J.; Tharakan, J.J.** (1989) Fatal outcome of group G streptococcal meningitis. *J. postgrad. Med.* **35** (1): 49-50
- Molinari, G.; Talay, S.R.; Valentin-Weigand, P.; Rohde, M.; Chhatwal, G.S.** (1997) The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalisation of group A streptococcal by epithelial cells. *Infect. Immun.* **65**:1357-1363
- Molinari, G.; Rohde, M.; Guzman, C.A.; Chhatwal, G.S.** (2000) Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cellular Microbiol.* **2**(2):145-154
- Muller, H.P.; Rantamaki, L.K.** (1995) Binding of native alpha 2-macroglobulin to human group G streptococci. *Infect. Immun.* **94**:492-496
- Myhre, E.; Krovnall, G.** (1977) Heterogeneity of nonimmune immunoglobulin Fc reactivity among gram-positive cocci: description of three major types of receptors for human immunoglobulin G. *Infect. Immun.* **17**(3):475-482
- Nakata, M.M.; Silvers, J.H.; George, W.L.** (1983) Group G streptococcal arthritis. *Arch. Intern. Med.* **143**(7):1328-1330
- Navarre, W.W.; Schneewind, O.** (1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:174-229
- Neufeld, E.B.; Cooney, A.D.; Pitha, J.P.; Dawidowicz, E.A.; Dwyer, N.K.; Pentchey, P.G.; Blanchetta-Mackie, E.J.** (1996) Intracellular trafficking of cholesterol moribred with cyclodextrin. *J. Biol. Chem.* **271**:21604-21613
- Nohlgard, C.; Bjorklind A.; Hammar, H.** (1992) Group G streptococcal infections on a dermatological ward. *Acta Derm. Venerol.* **72**(2):128-130
- Oster, H.R.; Bisno, A.L.** (2000) Group C and Group G streptococcal infections: epidemiologic and clinical aspects. *Gram-positive pathogens, ed. by Fischetti et al., American Society for Microbiology, Washington D.C.*, chapter 18:184-189
- Pancholi, V.; Chhatwal, G.S.** (2003) Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**(6):391-401
- Perez-Casal, J.; Price, J.A.; Maguin, E.; Scott, J.R.** (1993) An M protein with a single C repeat prevents phagocytosis of *Streptococcus pyogenes*: use of a temperature-sensitive shuttle vector to deliver homologues sequences to the chromosome of *S. pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **8**(5):809-819

- Pierschbacher, M.D.; Ruoslahti, E.** (1984) Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:5985-5988
- Pitha, J.; Irie, T.; Sklar, P.B.; Nye, J.S.;** (1988) Drug solubilizer to aid pharmacologists; amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.* **43**:493-502
- Preissner, K.T.** (1991) Structure and biological role of vitronectin. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **7**:275-310
- Proft, T.; Webb, P.D.; Handley, V.; Fraser, J.D.** (2003) Two novel superantigenes found in both group A and group C streptococcus. *Infect. Immun.* **71**:1361-1369
- Raeder, R.; Boyle, M.D.P.** (1998) Association between expression of immunoglobulin G-binding proteins by group A streptococci and virulence in a mouse skin infection model. *Infect. and Immun.* **61**(4):1378-1384
- Raeder, R.; Woischnik, M.; Podbielski, A.; Boyle, M.D.P.** (1998) A secreted streptococcal cysteine protease can cleave a surface-expressed M1 protein and alter the immunoglobulin binding properties. *Res. Microbiol.* **149**:539-548
- Reid, H.F.; Bassett, D.C.; Poon-King, T.; Zabriskie, J.B.; Read, S.E.** (1985) Group G streptococci in healthy school children and in patient with acute glomerulonephritis in Trinidad. *J. Hyg. (London).* **94**(1):61-68
- Reitmeyer, J.C.; Guthrie, R.K.; Steele, J.H.** (1990) Multiplication in human blood and deoxyribonuclease production by group G streptococci isolated from animals and humans. *Microbios.* **61**(246):33-37
- Rohde, M.; Müller, E.; Chhatwal, G.S.; Talay, S.** (2003) Host cell caveolae act as an entry-port for group A streptococci. *Cellular Microbiol.* **5**(5):323-342
- Ruoslahti, E.; Pierschbacher, D.M.** (1987) New prospective in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* **238**:491-497
- Sachse, S.; Seidel, P.; Gerlach, D.; Gunther, E.; Rodel, J.; Straube, E.; Schmidt, K.H.** (2002) Superantigen-like gene(s) in human pathogenic *Streptococcus dysgalactiae*, *subsp. equisimilis*: genomic localisation of the gene encoding streptococcal pyrogenic exotoxin G (speG<sup>(dys)</sup>). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **34**:159-167
- Schalen, C.; Zatterstrom, U.; Svensson, M.L.; Christensen, P.** (1983) Binding of aggregated IgG Fab-fragments and light chains to some group A, C and G streptococci. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **91**(1):27-33
- Schlievert, P.M.; Assimacopoulos, A.P.; Cleary, P.P.** (1996) Severe invasive group A streptococcal disease: clinical description and mechanisms of pathogenesis. *J. Lab. Clin. Med.* **127**:13-22

- Schmidt, K.H.; Kuhnemund, O.; Kohler, W.** (1987) A screening of streptococci freshly isolated from human and animal sources for binding of human IgG. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* **265**(3-4):420-429
- Schmidt, K.H.; Mann, K.; Cooney, J.; Kohler, W.** (1993) Multipel binding of type 3 streptococcal M protein to human fibrinogen, albumin, fibronectin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **7**:135-144
- Schnitzler, N.; Podbielski, A.; Baumgarten, G.; Mignon, M.; Kaufhold, A.** (1995) M or M-like gene polymorphisms in human group G streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **33**:356-363
- Schulze, K.; Medina, E.; Talay, S.R.; Towers, R.J.; Chhatwal, G.S.; Guzman, C.A.** (2001) Characterization of the domain of fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* responsible for elicitation of a protective immune response. *Infect. Immun.* **69**:622-625
- Schwarz-Linek, U.; Höök, M.; Potts, J.R.** (2004) The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol. Microbiol.* **52**(3):631-641
- Sjöbring, U.; Björck, L.; Kastern, W.** (1991) Streptococcal Protein G. Gene structure and protein binding properties. *J. Biol. Chem.* **266**:399-405
- Smoot, L.M.; McCormick, J.K.; Smoot, J.C.; Hoe, N.P.; Strickland, I.; Cole, R.L.; Barbian, K.D.; Earhart, C.A.; Ohlendorf, D.H.; Veasy, L.G.; Hill, H.R.; Leung, D.Y.; Schlievert, P.M.; Musser, J.M.** (2002) Characterization of two novel pyrogenic toxin superantigens made by an acute rheumatic fever clone of *Streptococcus pyogenes* associated with multiple disease outbreaks. *Infect. Immun.* **70**:7095-7104
- Soedermanto, I.; Lammler, C.** (1996) Comparative studies on streptococci of serological group G isolated from various origins. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* **43**(9): 513-523
- Stassen, M.; Muller, C.; Richter, C.; Neudorfl, C.; Hultner, L.; Bhakdi, S.; Walev, I.; Schmitt, E.** (2003) The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p38 mitogen-activated protein kinase - and protein kinase C- dependent pathways. *Infect. Immun.* **71**:6171-6177
- Stevens, D.L.; Tanner, M.H.; Winship, J.; et al.** (1989) Severe group A streptococcal infections associated with a toxic shock-like syndrome and scarlet fever toxin A. *New England J. Med.* **321**:1-6
- Stollermann, G.H.** (1991) Rheumatogenic streptococci and autoimmunity. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **61**:131-142
- Sriprakash, K.S.; Hartas, J.** (1997) Genetic mosaic upstream of scpG in human group G streptococci contains sequences from group A streptococcal virulence regulons. *Adv. Exp. Med. Biol.* **418**:749-751



- Sriprakash, K.S.; Hartas, J.** (1995) Lateral genetic transfers between group A and group G streptococci for M-like genes are ongoing. *Microbial Pathogen*. **20**:275-285
- Talay, S.R.; Ehrenfeld, E.; Chhatwal, G.S.; Timmis, K.N.** (1991) Expression of the fibronectin-binding components of *Streptococcus pyogenes* in *Escherichia coli* demonstrates that they are proteins. *Mol. Microbiol.* **5**:1727-1734
- Talay, S.R.; Grammel, M.P.; Chhatwal, G.S.** (1996) Structure of a group C streptococcal protein that binds to fibrinogen, albumin and immunoglobulin G via overlapping modules. *Biochem. J.* **315**:577-582
- Talay, S.R.; Valentin-Weigand, P.; Jerlström, P.G.; Timmis, K.N.; Chhatwal, G.S.** (1992) Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: Sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect. Immun.* **60**:3837-3844
- Talay, S.R.; Zock, A.; Rohde, M.; Molinari, G.; Oggioni, M.; Pozzi, G.; Guzman, C.A.; Chhatwal, G.S.** (2000) Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **2**:521-535
- Tang, P.; Foubister, M.; Pucciarelle, G.; Finlay, B.B.** (1993) Methods to study bacterial invasion. *J. Microbiol. Meth.* **18**:227-240
- Terao, Y.; Kawabata, S.; Kunitomo, E.; Murakami, J.; Nakagawa, I.; Hamada, S.** (2001) Fba, a novel fibronectin-binding protein from *S. pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the *fba* gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol. Microbiol.* **42**:75-86
- Tillit, S.K.; Edwards, L.B.; Garner, R.L.** (1934) Fibrinolytic activity of haemolytic streptococci: development of resistance of fibrinolysis following acute hemolytic streptococcus infections. *J. Clin. Invest.* **13**:47-78
- Timoney, J.F.; Artiushin, S.C.; Boschwitz, J.S.** (1997) Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-like proteins SeM and SzPSe. *Infect. Immun.* **65**:3600-3605
- Towers, J.R.; Fagan, P.K.; Talay, S.R.; Curie, B.J.; Sriprakash, K.S.; Walker, M.J.; Chhatwal, G.S.** (2003) Evolution of *sfbI* encoding streptococcal fibronectin-binding protein I: horizontal gene transfer and gene mosaic structure. *J. Clin. Microbiol.* **41**(12):5398-5406
- Valentin-Weigand, P.; Talay, S.R.; Timmis, K.N.; Chhatwal, G.S.** (1994) Identification of a fibronectin-binding protein as adhesin of *streptococcus pyogenes*. *Zbl. Bakt.* **278**:238-245

- Valentin-Weigand, P.; Traore, M.Y.; Blobel, H.; Chhatwal, G.S.** (1990) Role of  $\alpha_2$ -macroglobulin in phagocytosis of group A and C streptococci. *FESM Microbiol. Lett.* **70**:321-324
- Vasi, J.; Frykberg, L.; Carlsson, L.E.; Lindberg, M. Guss, B.** (2000) M-like proteins of *streptococcus dysgalactiae*. *Infect. Immun.* **68**:294-302
- Visai, L.; Bozzini, S.; Raucci, G.; Toniolo, A.; Speziale, P.** (1995) Isolation and characterization of a novel collagen-binding protein from *Streptococcus pyogenes* strain 6414. *J. Biol. Chem.* **270**:347-353
- Walter, R.; Siegel, M.; Malke, H.** (1989) Nucleotide sequence of the streptokinase gene from a group G streptococcus. *Nucleic. Acid Res.* **17**:1262
- Wexler, D.E.; Cleary, P.P.** (1985) Purification and characteristics of the streptococcal chemotactic factor inactivator. *Infect. Immun.* **39**:239-246
- Wheeler, R.C.; Chaiban, J.E.; Johnston, K.H.** (1992) Analysis of the streptokinase gene from group C streptococci (*S.equisimilis* and *S.zooepidemicus*) by the polymerase chain reaction and possible relation to post-streptococcal glomerulonephritis. *New Perspectives on streptococcal infections ed. Orefici, G.* : 343-345. Stuttgart, New York, Jena: Gustav Fischer.
- Wilson, C.B.; Jakobs, R.F.; Smith, A.L.** (1982) Cellular antibiotic pharmacology. *Semin. Perinatol.* **6**:205-213

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonsäure)-Diammonium-Salz
AD	Aromatische Domäne
AK	Antikörper
Ap <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Aminopersulfat
ARF	akutes rheumatisches Fieber
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CFU	koloniebildende Einheiten
CHD	chronische Herzkrankheit
Ci	Curi
cpm	Zähler pro Minute (counts per minute)
Da	Dalton
DER 732	Polyglycoll-Dieoxid
DMEM	Dulbecco's Modiefied Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>et al.</i>	et alteri
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunnachweis
EM	Elektronenmikroskopie
ERL 4206	Vinylcyclohexendioxid (Kettenstarter)
FACS	Durchflusszytometer
FESEM	Feldemissionsrasterelektronenmikroskopie
FCS	fetales Kälberserum
FBR	Fibronektin bindende Region
FBS	Fibronektin bindender Spacer
Fn	Fibronektin
Fn30	30 kDa Fibronektinfragment
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
Fn45	45 kDa Fibronektinfragment
Fn70	70 kDa Fibronektinfragment
g	Gramm
GAS	Gruppe A Streptokokken
GCS	Gruppe C Streptokokken
Gfbl	Gruppe G Streptokokken Fibronektinbindendes Protein
GGs	Gruppe G Streptokokken
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
His-Tag	Histidin markiert
Ig	Immunglobulin
IF	Immunfluoreszenz
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar
kDa	KiloDalton
l	Liter
$\lambda$	Lambda Phage
LB	Luria-Bertani
M	molar
MA	Membrananker
mAb.	monoclonal
mM	millimolar
Min.	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mol	Stoffmenge
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
Na	Natrium
NSA	Nonenylberstensäureanhydrid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
pAb.	polyclonal
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEL	Post-Embedding-Labeling
pH	pH-Wert
PI	Präimmunserum
PVDF	Polyvinylidendifluorid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RF	rheumatisches Fieber
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
Sfbl	streptococcal fibronectin binding protein class I
SPE	Pyrogene Exotoxine von Streptokokken
TA	Trisacetat
TCA	Trichloreisessigsäure
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TEMED	N,N,N,N,- Tetramethylethyldiamin
THY	Todd Hewitt Broth mit Hefe (Yeast)
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TSB	Tryptic Soy Broth
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Amino-Methan
Tritc	Tetramethylrhodamine-Isothiocyanate
TSLS	Toxischer Schock Syndrom
U	Units
ü.N.	über Nacht

---

U/min	Umdrehungen pro Minute
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vir	Virulenz
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich den Kollegen und Menschen danken, die fachlich wie auch persönlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Die Experimente entstanden in der Abteilung für Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung im Bereich Mikrobiologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. S. Chhatwal für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und für die Übernahme des Referates.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Jahn für die Übernahme des 2. Referates.

Dr. M. Rohde und E. Müller danke ich für die schnelle, gute Einweisung in die Elektronenmikroskopie. Durch die praktischen Tipps von E. Müller und E. Barth gelang es, den Puffern, Harzen und der Ultramikrotomie Herr zu werden. Fragen wie „warum seh ich jetzt nichts..?“ konnten dank Dr. M. Rohdes Kompetenz schnell gelöst werden, so dass alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Eigenanfertigung entstanden.

Mein herzlichster und persönlichster Dank gilt Dr. K. Dinkla und Dr. D. Zähler für die spontane, freundliche Übernahme einer fairen und sehr kompetenten Betreuung. Dr. D. Zähler ermöglichte, dank ihrer Kompetenz und freundlichen Diskussionsbereitschaft, die Generierung der Mutante. Auch bei der Anfertigung von Abstracts und Postern war sie ein hilfreicher Ratgeber. Dr. Dinkla gilt mein besonderer Dank. Sie stand mir mit ständiger Diskussionsbereitschaft, fachlichem Interesse an den Versuchen und absoluter Kompetenz als Betreuer zur Seite. Beiden möchte ich vor allem auch für ihre Fairness und für die freundliche Worte bedanken, welche der Motivation und dem Spaß an der Durchführung der Dissertation sehr zuträglich waren.

Dem Sequenzierteam aus Labor D0.08 danke ich für die Bestimmung der DNA-Sequenzen, sowie K. Mummenbrauer für die Einweisung in das Zelllabor.

Ebenfalls danke ich Priv. Doz. S. Hammerschmidt und A. Dröge für die Unterstützung bei den ersten Schritten in der Molekularbiologie.

Vielen Dank auch für die Durchsicht der Manuskripte an Dr. K. Dinkla und Dr. M. Rohde, sowie für die Hilfe am PC durch die PC-Manager P. Wolff und Dr. K. Dinkla.

Mein Dank gilt auch denjenigen Mitarbeitern, die durch kollegiales Miteinander eine konstruktive und ehrlich-sympathische Zusammenarbeit ermöglichten.

Ganz besonderen, innigen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützten und zum Gelingen dieser Dissertation beitrugen. Auch all meinen Freunden ein Dankeschön für ihre Unterstützung und Geduld.